

**DIE STRICTOSIDINSYNTHASE
AUS RAUWOLFIA SERPENTINA:
ISOLIERUNG, CHARAKTERISIERUNG
UND ARBEITEN ZUR KLONIERUNG
EINES PFLANZLICHEN
SEKUNDÄRSTOFFWECHSELENZYMS**

Norbert Hampp



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554630_0005

DIE STRICTOSIDINSYNTHESE AUS RAUWOLFIA SERPENTINA:
ISOLIERUNG, CHARAKTERISIERUNG UND ARBEITEN ZUR KLONIERUNG
EINES PFLANZLICHEN SEKUNDÄRSTOFFWECHSELENZYMS

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Norbert Hampf
aus
München

Juli 1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. H. Zenk
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker
- Tag der mündlichen Prüfung: 29.7.1986

für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	7
II. MATERIAL und METHODEN	16
1. Pflanzliche Zellkulturen	16
2. Synthese radioaktiv markierter Verbindungen ...	17
3. Enzymaktivitätstests	19
3.1 Strictosidinsynthese	19
3.2 Strictosidinglukosidase	23
3.3 unspezifische Glukosidasen	26
4. Proteinpräparative Methoden	28
5. Proteinanalytische Methoden	38
5.1 Proteinbestimmung	38
5.2 Gelelektrophoretische Verfahren	39
5.3 Aminosäureanalyse	41
5.4 Kohlenhydratanalyse	43
5.5 Gelpermeationschromatographie	47
6. Enzymimmobilisierungen	47
7. Immunologische Verfahren	48
8. Proteinsequenzierung	50
9. Oligonukleotide	53
10. Präparation pflanzlicher poly-A ⁺ -m-RNA	57
11. DNA - präparative Methoden	59
12. Analytische Methoden für DNA und RNA	64
13. Klonierungsvektoren	69
13.1 Lambda-Phagen	69
13.2 pUC-Plasmide	72
14. Hybridisierungen	80
15. DNA - Sequenzierung	86

	Seite
III. ERGEBNISSE	94
1. Wahl eines geeigneten Rohmaterials für die Isolierung der Strictosidinsynthese	94
2. Anzucht von Pflanzenmaterial	97
2.1 Auswahl der Kulturgefäße	98
2.2 Methode zur zerstörungsfreien Bestimmung der Wachstumsphase	101
2.3 Experimentelle Überprüfung der Methode	120
3. Ermittlung der Basisdaten für die Anreicherung der Strictosidinsynthese und ihrer Folgeenzyme	130
3.1 Gewinnung der löslichen Proteinfraction ...	131
3.2 HPLC - Trennungen	133
3.3 Weitere Differenzierung der untersuchten Enzyme	138
4. Isolierung der Strictosidinsynthese aus Suspen- sionszellkulturen von <u>Rauwolfia serpentina</u>	142
4.1 Übersicht ergänzender Reinigungsmethoden ..	142
4.2 Präparative Isolierung der Strictosidin- synthese	154
4.3 Reinheitskontrolle der Enzympräparationen .	158
5. Charakterisierung der Strictosidinsynthese	161
5.1 pH-Optimum	161
5.2 Temperaturoptimum	162
5.3 Michaelis-Menten Konstante	163
5.4 Wechselzahl	165
5.5 Substratspezifität	165
5.6 Enzymstabilität	166
5.7 Molekulargewicht	168
5.8 Isoelektrischer Punkt	169
5.9 Aminosäurezusammensetzung	170
5.10 Nachweis der Glykoproteineigenschaft Identifizierung und Quantifizierung der Zucker	171
5.11 Enzymtoleranz	174

	Seite
6. Immobilisierung der Strictosidinsynthase	175
6.1 Vergleich verschiedener Immobilisierungs- techniken	175
6.2 Stabilität CNBr-immobilisierten Enzyms	176
6.3 Produktion von Strictosidin	177
6.4 Identität und Reinheit des Produktes	178
7. Aminosäuresequenzanalyse	180
7.1 Blockierung des N-Terminus	180
7.2 Präparation von Peptiden	180
7.3 Sequenzanalyse isolierter Peptide	183
8. Oligonukleotide als Hybridisierungs-Probe	184
8.1 Auswahlkriterien für geeignete Amino- säuresequenzen	185
8.2 Reinigung der Oligonukleotide	187
8.3 Markierung mit ^{32}P -dATP	188
9. Strategien für die Klonierung von pflanzlichen Sekundärstoffwechselenzymen	190
9.1 c-DNA Synthese	191
9.2 Genomische Genbanken in Lambda-Phagen	194
9.3 Detektionssysteme	195
10. Anreicherung von poly-A ⁺ -m-RNA	197
10.1 Ausbeute der m-RNA Isolierung	197
10.2 Hybridisierungen mit 14-mer Oligonukleotid	198
11. Reinigung von Pflanzen-DNA	200
11.1 Isolierung der Gesamt-DNA aus Suspensionszellkulturen	201
11.2 Bestimmung des G/C-Gehaltes	205
11.3 Anwendung auf andere Zellkulturen	206
12. Klonierung mit Lambda-Phagen	207
12.1 Auswahl eines geeigneten Phagen	207
12.2 Gewinnung von Phagenpartikeln	207

	Seite
12.3 Präparation eines effizienten Vektors	208
12.3.1 Ligation zu linearen Multimeren ...	209
12.3.2 Trennung der DNA-Fragmente in Saccharosegradienten	210
12.3.3 Verifizierung der Vektor- charakteristika	211
12.4 Gewinnung von Pflanzen-DNA-Fragmenten für die Klonierung mit Charon4A-Vektor ...	215
12.5 Ligation der DNA-Fragmente aus Tina30 mit Charon4A-Vektor DNA, <u>in-vitro</u> -Verpackung und Bestimmung der Rekombinantenzahl	216
12.6 Nachweis der Klonierung von Pflanzen-DNA .	219
12.7 Suche mit Oligonukleotiden nach hybridi- sierenden Phagenklonen	223
13. Klonierung vorselektierter Pflanzen-DNA	224
13.1 Hybridisierung von DNA aus <u>R. serpentina</u> mit verschiedenen Oligonukleotidgemischen.	229
13.2 Hybridisierung von DNA aus Pflanzen ver- schiedener Familien mit dem Oligonukleo- tidgemisch HA5	230
13.3 Präparation von Pflanzen-DNA Fragmenten ..	232
13.4 Klonierung der DNA-Fragmente aus <u>R. serpentina</u> mit pUC19 - Plasmidvektor ..	233
13.5 Isolierung von Rekombinanten, die mit dem Oligonukleotidgemisch HA5 hybridisieren ..	235
13.6 Sequenzierung der isolierten Klone	242
IV. DISKUSSION	253
V. ZUSAMMENFASSUNG	264
VI. LITERATURVERZEICHNIS	266

Verwendete Abkürzungen

bidest.	zweifach destilliert
Bp	Basenpaare
Bq	Becquerel (=1/s)
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
°C	Grad Celsius
dATP	2'-Desoxy-adenosin-5'-triphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP	2'-Desoxy-cytidin-5'-triphosphat
DEAE-	Diethylaminoethyl-
dem.	demineralisiert
dGTP	2'-Desoxy-guanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTE	Dithioerythritol
dTTP	2'-Desoxy-thymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMK	Erlenmeyerkolben
FBK	Fernbachkolben
GC	Gaschromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie
GPS	Gasphasensequencer
h	Stunde(n)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HRP	Horse Radish Peroxidase = Meerrettichperoxidase
IEC	Ionenaustauschchromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
Insert	insertierte Fremd-DNA in Vektor-DNA
IP	Isoelektrischer Punkt
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
kat	Katal (Einheit der Enzymaktivität)
kb	Kilobasenpaare
Lux	Beleuchtungsstärke (= lumen/m ²)
M	Molar
m-RNA	Messenger-Ribonukleinsäure

MW	Molekulargewicht
NC	Nitrocellulose
OD	Optische Dichte
pfu	plaque forming unit (Plaque bildende Einheit)
PTH-	Phenylhydantoin
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
Tina30	Zellkulturstamm von <u>Rauwolfia serpentina</u>
TiSS	<u>Rauwolfia serpentina</u> Strictosidinsynthase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Aktivitätseinheit)
Ük	Übernachtkultur
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
WMM	Werkmann-Minimalmedium
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid

I. EINLEITUNG

Arzneimittel - ein Zivilisationsgut

Jeder hat im Laufe seines Lebens schon Medikamente zu sich genommen. Die Anwendung von Arzneimitteln, wie auch die Forschung nach neuen Arzneistoffen, ist ein integraler Bestandteil unserer Zivilisation.

Medizin - als Wissenschaft wie auch als Dienstleistung - hat sich in allen uns bekannten Kulturen entwickelt. Unabhängig davon, wie verschieden die einzelnen, sich entwickelnden Zivilisationen waren und sind, der Wunsch, ihr Lebensschicksal zu beeinflussen, Krankheiten zu wehren und ihr Dasein zu verlängern, ist allen gemein und liegt wohl tiefer - ist im menschlichen Wesen verwurzelt.

So läßt sich die "medikamentöse Therapie" auch weit über unsere Zeitrechnung hinaus zurückverfolgen. Damals wie heute suchte man zu allen Gebrechen und Erkrankungen "das Kraut, das dagegen gewachsen ist"; die Methoden haben sich inzwischen verändert; man geht wissenschaftlich vor - systematisch; man "extrahiert und reduziert" - sucht das "wirksame Prinzip".

Die Erfolge dieses Bestrebens finden wir in einer Vielzahl von Tabletten, Kapseln, Tropfen und anderen Arzneiformen enthalten. Häufig gehört deren Inhaltsstoff in die Klasse der Alkaloide, eingesetzt als Reinstoff oder als Alkaloidgemisch.

Viele therapeutisch verwendete Alkaloide werden auch heute noch aus Pflanzenmaterial extrahiert. Vollsynthesen sind zwar durchgeführt worden, haben aber wegen der komplizierten Stereochemie der Verbindungen niedrige Ausbeuten und sind unwirtschaftlich. Von den synthetischen Arzneistoffen leiten sich einige von Naturstoffen ab, stellen eine Reduktion des "wirksamen Prinzips" auf Teile eines Mustermoleküls dar. Diese einfachen Stoffe weisen oft sogar Vorteile gegenüber ihren natürlichen Verwandten auf, sind thermodynamisch stabiler, oder in geringeren Konzentrationen wirksam und lassen sich billig synthetisch herstellen.

Dennoch haben, trotz aller Anstrengungen der Chemie, natürliche Alkaloide wie Codein und Morphin, Ajmalin und Reserpin, bis heute ihre Stellung in der Pharmazie behauptet.

Um das Potential dieser Stoffklasse intensiver nutzen zu können, müssen neue Wege für die Darstellung dieser, oft mehrere Asymmetriezentren besitzenden Moleküle gefunden werden, denn meist ist nur eines der stereochemischen Isomeren pharmakologisch wirksam. Wer könnte für dieses Anliegen eine bessere Lehrmeisterin sein als Mutter Natur.

Biosynthese - ein Evolutionsprodukt

Alkaloide, definiert als Pflanzenbasen mit zyklisch gebundenem Stickstoff, finden sich in beeindruckender Vielfalt in der Natur. Etwa 6000 verschiedene Alkaloide, die sich in mehrere Familien gliedern lassen, sind uns heute bekannt. Eine der größten Gruppen mit etwa 1200 bekannten Vertretern, sind die Indolalkaloide.

Die Aufklärung der Indolalkaloidbiosynthese begann mit der Identifikation von Vorstufen und Intermediaten. Arbeiten von LEETE (1960 und 1961), KUTNEY et.al. (1968), BATTERSBY et.al. (1969) u. a. brachten Aufklärung über die Biogenese des Indolteils. Die Herkunft des monoterpenoiden Anteils wurde durch Arbeiten von BATTERSBY et.al. (1966), LOEW und ARIGONI (1968) und LOEW (1969) in Übereinstimmung mit dem Postulat von THOMAS (1961) und WENKERT (1962) geklärt.

Tryptamin, abgeleitet von der Aminosäure Tryptophan, und Secologanin, ein Iridoid-Glukosid terpenoiden Ursprungs, wurden als unmittelbare Vorstufen in der Indolalkaloidbiosynthese identifiziert. Deren Kondensationsprodukt, welches den Namen Strictosidin erhielt, schrieb schon SMITH (1968) eine Schlüsselstellung in der Biosynthese der Indolalkaloide zu, was weitere Untersuchungen (HUTCHINSON et.al. (1974), HECKENDORF und HUTCHINSON (1977)) bekräftigten.

Der endgültige Beweis für die zentrale Rolle des 3 α (S)-Strictosidins konnte erst nach Einsatz von Suspensionszellkulturen

und zellfreien Systemen an einem auf Indolalkaloidproduktion optimierten System aus Catharanthus roseus erbracht werden (STÖCKIGT und ZENK (1977a u. 1977b)).

Verschiedene andere Arbeitsgruppen bestätigten in der Folgezeit 3 α (S)-Strictosidin (früher auch als Isovincoisid bezeichnet) als alleinige universelle biosynthetische Vorstufe der Monoterpen-Indolalkaloide (SCOTT et.al. (1977a u. 1978), BROWN et.al. (1978)).

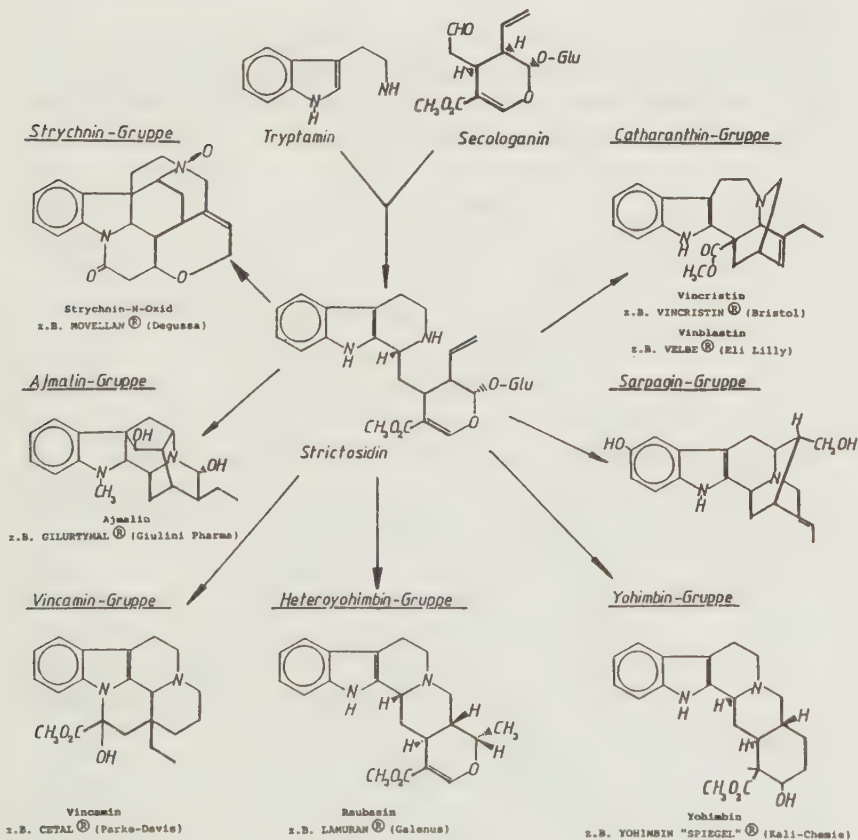


Abb. 1 Übersicht der Indolalkaloidgruppen die sich von Strictosidin ableiten mit einigen Arzneispezialitäten, die einen Vertreter dieser Gruppe enthalten

Der Einsatz dieses bereits so erfolgreich angewendeten Systems aus Catharanthus roseus brachte rasante Fortschritte in der Aufklärung weiterer Intermediate der Heteroyohimbin- und Ajmalin-Gruppe (STÖCKIGT und ZENK (1977a u. b), STÖCKIGT und HUSSON et.al. (1977), STÖCKIGT (1976), TREIMER und ZENK (1978), STÖCKIGT et.al. (1977), STÖCKIGT (1979)).

Hand in Hand ging dabei die Erforschung der beteiligten Enzyme. Viele konnten nachgewiesen, angereichert und charakterisiert werden (TREIMER (1979), HEMSCHIEDT (1979), HEMSCHIEDT (1983), PFITZNER (1984)).

Die Biosynthese der Heteroyohimbinalkaloide ist heute vollständig aufgeklärt (ZENK (1982)) und der von SCOTT (1977b) postulierte Reaktionsweg eindeutig widerlegt.

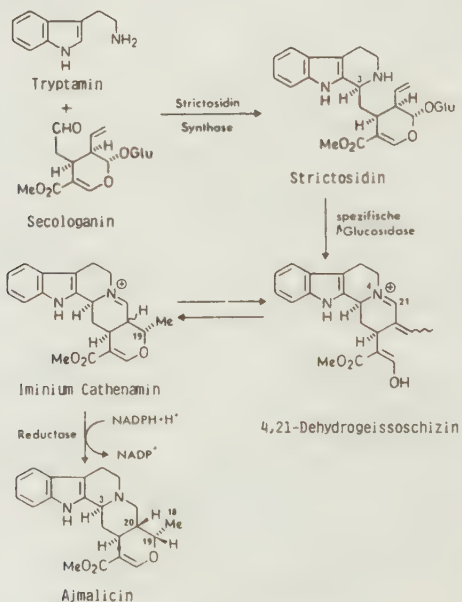


Abb. 2 Biosyntheschema der Heteroyohimbinalkaloide (vereinfacht nach ZENK (1982))

Andere Zweige der Indolalkaloidbiosynthese sind ebenfalls bereits gut untersucht oder befinden sich noch in der Erforschung (STÖCKIGT et.al. (1983), PFITZNER et.al. (1984), PFITZNER und STÖCKIGT (1983), PFITZNER A. (1984), STÖCKIGT (1980)).

Es ist abzusehen, daß ebenso detaillierte Erkenntnisse wie für die Heteroyohimbinalkaloide auch für die verwandten Klassen in nicht allzuferner Zukunft vorliegen werden.

Biotechnologie - Natur en gros

Eine naheliegende, man kann schon sagen zwingende Konsequenz aus diesen Erkenntnissen ist der Wunsch, Biosyntheseschritte ebenso wie bei ihren Entdeckungen im Reagenzglas, im technischen Maßstab zur industriellen Nutzung ablaufen zu lassen. Doch dieses "Scale up" um viele Größenordnungen ist es, das schon in der Vergangenheit dafür gesorgt hat, daß es um manche optimistische, ja bisweilen euphorische Prognose über die sich auftuenden Möglichkeiten bald wieder still wurde. Man muß sich diese Dimensionsänderung einmal deutlich vor Augen führen.

Um einen Patienten beispielsweise mit Reserpin zu therapieren, benötigt man 1 mg/Tag; im Falle von Ajmalicin sind es schon 60 mg/Tag, bei Ajmalin ist der Bedarf sogar 200 mg/Tag. Für eine industrielle Fertigung solcher Arzneimittel wird der Arzneistoff also in Kilogrammengen benötigt. Damit eine biotechnologische Synthese wirtschaftliche Bedeutung erlangen kann, muß sie - über ihre theoretische Machbarkeit hinaus - in Kapazität und Kosten konkurrenzfähig mit der althergebrachten Gewinnung dieser Stoffe aus Drogenmaterial sein. Das bedeutet im Falle des Ajmalicins, daß der Kilogrammpreis von 1500.- DM nicht überschritten werden darf.

Im Rahmen der Biosyntheseforschung werden Experimente gemacht, in denen einige Mikrogramm Substanz umgesetzt werden, was für analytische Nachweise vollkommen ausreichend ist. Selbst "präparative Ansätze" erbringen nur Milligrammengen. Um aber den geschilderten industriellen Bedarf auf diese Weise decken zu können, muß eine Vergrößerung des Maßstabs um das Millionen-

fache vorgenommen werden. Aus Milligramm- müssen Kilogrammengen werden. Der Unterschied ist ebenso, als ob ich mich mal eben auf den Weg zur Apotheke um die Ecke (angenommene Entfernung 300 m), oder auf eine Reise zum Mond aufmache (bekannte Entfernung mehr als 300 000 000 m). Ersteres können wir am besten ohne unnötige technische Hilfsmittel erreichen, für letzteres sind sie essentiell.

Für den Endpreis eines Produktes spielen nicht nur die Rohstoffkosten eine Rolle, auch die Investitionen für die Fertigungsmaschinen müssen amortisiert werden. Bei den analytischen Umsetzungen geht das katalysierende Enzym verloren. Da diese Proteine aber sehr kostbar sind, lassen sich durch reine Übertragung der analytischen Methoden in einen größeren Maßstab keine marktfähigen Produkte erzeugen.

Die lebende Zelle kompartimentiert ihre Enzyme und hat Mechanismen entwickelt, diese Kompartimente mit Rohstoffen d.h. Vorstufen zu beschicken und die Fertigwaren bzw. Produkte abzutransportieren. In der Wirkung vergleichbar ist es, wenn es uns gelingt die gewünschten Enzyme in reiner Form, um Nebenreaktionen zu vermeiden, an einer festen Phase in aktiver Form zu immobilisieren. In einer flüssigen Phase können dann Substrate zu- und Produkte abgeführt werden und man erzielt einen kontinuierlichen Reaktionsablauf.

Doch hierin liegen zwei weitere Probleme verborgen. Das erste ist die Darstellung ausreichender Enzymmengen in reiner Form und das zweite ist die begrenzte Lebensdauer, sowohl der löslichen als auch der immobilisierten Enzyme.

Die Enzyme, um die es hier geht, entstammen dem Sekundärstoffwechsel der Pflanzen, gehören mithin zu den seltenen Proteinen der Zelle. Die Zellkulturtechnik, welche für die Enzymgewinnung, nicht nur wegen ihrer Fähigkeit Rohmaterial kontinuierlich bereitzustellen, eine der wichtigsten Voraussetzungen ist, hat uns dank sensibler Selektionsverfahren (DEUS (1980), ARENS (1976)) Hochleistungsstämme beschert, mit einer - im Vergleich zu intakten Pflanzen - vervielfachten Leistung einzelner Stoffwechselwege. Dennoch ist die Ausbeute an homogenem Enzym selbst

bei höchstproduzierenden Stämmen niedrig. Ein Milligramm gesuchtes Protein aus ein Kilogramm Gewebematerial ist ein sehr guter Wert. Meist liegen die Gehalte noch wesentlich niedriger. Der entstehende Reinigungsaufwand wird klar, wenn man sich vor Augen führt, daß ein Enzym in aktiver Form aus einem Gemisch von mehreren tausend unterschiedlichen, aber in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften dennoch sehr ähnlichen Proteinen einer Zelle abgetrennt werden muß, das am Gesamtproteingehalt einen Anteil weit unter ein Promill hat.

Wenn es gelingt ein Protein ausreichend anzureichern, so findet sich im allgemeinen auch eine geeignete Immobilisierungsmethode dafür. In der Literatur wurde überdies wiederholt berichtet, daß die Stabilität eines Enzyms durch diese Prozedur zugenommen habe. Dennoch bleibt sie beschränkt und außerdem wird durch die Immobilisierung selbst ein bisweilen sehr erheblicher Anteil der eingesetzten Enzymaktivität zerstört. So vielversprechend die Aspekte sind, die sich durch den Einsatz immobilisierter Enzyme in der Biotechnologie eröffnen - erst durch die Verfügbarkeit einer billigen, d.h. einfach aufzuarbeitenden Enzymquelle hohen Gehalts erlangen sie ihre volle Schlagkraft.

Zur Erschließung solcher Quellen, die leichter zu handhaben und aufzuarbeiten sind als Pflanzenzellen, gibt es zwei denkbare Ansätze:

Zum einen sollte man versuchen, die katalytischen Fähigkeiten des Enzymmoleküls auf molekularer Ebene zu ergründen und ein Proteinmolekül, reduziert um alle für die reine Funktion nicht essentiellen Teile, chemisch zu synthetisieren. Doch dazu fehlen heute noch ausreichende Kenntnisse über die Physik der Katalyse so komplexer Reaktionen, um mit einem schnellen Erfolg rechnen zu können.

Der zweite und heute schon gangbare Weg ist, das Gen des Enzymmoleküls zu suchen und in einem weniger komplexen Organismus als der Pflanzenzelle zur Expression zu bringen. Diese ist z.B. mit geeigneten Promotoren in Bakterien sehr gut steuerbar und man erhält im Erfolgsfall ein System, in dem das gewünschte Protein nicht eines (noch dazu mit verschwindend

geringem Anteil) unter Tausenden ist, sondern das prominenteste. Mit der Verfügbarkeit einer solchen Enzymquelle ist der Weg von der wissenschaftlichen Erkenntnis zur industriellen Umsetzung frei.

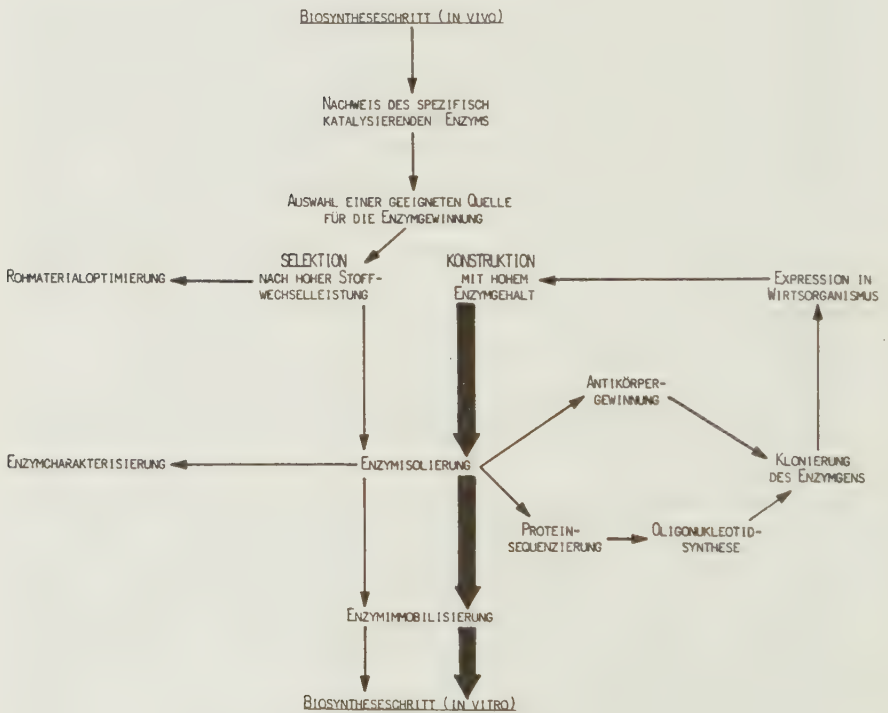


Abb. 3 Schematische Darstellung der Strategie für den Einsatz von Sekundärstoffwechselenzymen in der Biotechnologie

Um dieses ehrgeizige Ziel zu erreichen, Biosyntheseschritte des Sekundärmetabolismus in kommerziell verwertbarem Maßstab aus der Pflanze ins Laboratorium zu übertragen, muß eine ganze Kaskade von Teilproblemen gelöst werden. Diese Zusammenhänge sind in der obigen Graphik dargestellt.

Gegenstand dieser Arbeit war es, für das Enzym Strictosidinsynthase, welches die Kondensation von Tryptamin und Secologanin zu Strictosidin, dem zentralen biosynthetischen Intermediat der Monoterpenoidalkaloide, katalysiert, eine Quelle zu finden und Methoden zu entwickeln, mit deren Hilfe es möglich ist, Milligrammengen homogener Enzympräparationen bereitzustellen. Neben einer detaillierten Enzymcharakterisierung und dem Nachweis der Immobilisierbarkeit in aktiver Form sollten die Techniken zur Klonierung pflanzlicher Sekundärstoffwechselenzyme entwickelt werden. Dies beinhaltet insbesondere die Proteinsequenzierung, die Erarbeitung eines geeigneten Klonierungssystems und die Gewinnung von Pflanzen-Genbanken. Dabei war den spezifischen Eigenschaften von pflanzlichen Zellkulturen Rechnung zu tragen. Den vielen Vorteilen, die sie bieten, stehen einige Nachteile gegenüber. Dabei ist besonders zu erwähnen, daß bisweilen nur unvollständige Biosynthesewege beobachtet werden können. So bilden die im Hause geführten Zellkulturen von Catharanthus roseus kein Vinblastin und Vincristin - beides wertvolle Cytostatika. Einige Enzyme, die für die Biosynthese nötig sind, werden offensichtlich nicht exprimiert. Die entsprechenden Gene sind selbstverständlich vorhanden, werden jedoch nicht transkribiert. Die zu entwickelnden Techniken sollten solche "schlafenden" Gene berücksichtigen, indem einer Suche nach Pflanzengenen auf genomischer Ebene besondere Aufmerksamkeit geschenkt wurde.

II. MATERIAL und METHODEN

1. Pflanzliche Zellkulturen

1.1 Herkunft

Die verwendeten Zellkulturstämme SR28, RT71 und MT55 waren aus Catharanthus roseus (L.) G. Don gewonnen und von DEUS (1980) auf hohen Alkaloidgehalt hin selektioniert worden.

Die Kultur Tina30, die mir Herr Prof. Dr. M. H. Zenk freundlicherweise zur Verfügung stellte, war aus einer aus Lucknow, Indien, stammenden Pflanze von Rauwolfia serpentina (L.) Benth. ex. Kurz angezogen worden.

Alle genannten Stämme sind stabil und seit mehreren Jahren sowohl als Kallus- wie auch als Suspensionskultur im Hause geführt.

1.2 Kultivierungsbedingungen

Zur Anzucht der angeführten Stämme als Suspensionskulturen fanden 1l Erlenmeyerkolben mit 250 ml Medium bzw. Fernbachkolben mit 1000 ml Medium Verwendung.

Die Kultivierung erfolgte auf Rundschüttlern (Radius der Kreisbewegung 2.5 cm) bei 100 Upm in vollklimatisierten Räumen mit 70% relativer Luftfeuchtigkeit und konstanter Beleuchtung von 600 Lux. Den Gasaustausch der Kulturen mit der Umgebungsluft ermöglichten autoklavierbare Schaumstoffstopfen, die als Verschuß für die Kulturgefäße dienten.

Die Stämme SR28, RT71 und MT55 wurden bei 23°C, Tina30 bei 27°C gehalten.

Die Kulturen wurden regelmäßig unter sterilen Bedingungen in frisches Medium überimpft.

1.3 Medien und Sterilisationsverfahren

Die Chemikalien für die Nährmedien stammten von den Firmen Merck und Fluka und hatten Analysenqualität. Das Wasser wurde

mit Hilfe einer zweistufigen Ionenaustauscheranlage vollentsalzt.

Folgende Nährmedien fanden Verwendung:

LS	nach LINSMAIER und SKOOG (1965)
Ringe	nach RINGE (1972)
AP	nach ZENK <u>et.al.</u> (1977)

Alle Medien und Gefäße wurden bei 121°C und 1 bar Überdruck 23 Minuten im Heißdampf autoklaviert.

1.4 Ernte der Gewebe und Lagerung

Die Ernte der Suspensionkulturen erfolgte durch Überführen in einen Büchnertrichter mit eingelegtem Nylonnetz(1) und Abtrennung des verbrauchten Nährmediums durch Vakuumfiltration. Der erhaltene Gewebekuchen wurde umgehend in eine flache Wanne überführt, zerkrümmelt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Lagerung so gewonnen Zellmaterials erfolgte bei -20°C.

Frau U. Wiesmüller, Frl. G. Hagemann, Frl. M. Haasemann und Frau L. Colberg danke ich herzlich für ihre sorgfältige und zuverlässige Hilfe und Zusammenarbeit bei der Pflege der Zellkulturen und Anzucht des Pflanzengewebes.

2. Synthese radioaktiv markierter Verbindungen

2.1 2-³H-Tryptamin

Die Synthese und Reinigung von spezifisch in 2-Stellung tritiiertem Tryptamin erfolgte nach einer Vorschrift von TREIMER (1979). Dabei wird 2-³H-Indol-3-yl-glyoxalamid mit Lithiumaluminiumhydrid zu 2-³H-Tryptamin reduziert. Die Vorstufe stammte aus einer Synthese von Herrn Dr. Treimer.

(1) 6400 Maschen/cm² bzw. 75 µm Maschenweite
VEREINIGTE SEIDENWEBEREIEN AG, Kempen

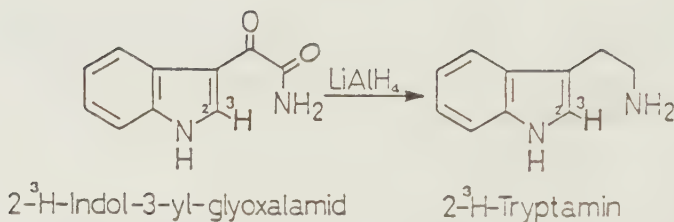


Abb. 4 Reduktion von 2-³H-Indol-3-yl-gloxalamid zu 2-³H-Tryptamin

2.2 3-³H-Strictosidin

In Position 3 tritiiertes Strictosidin wurde mittels gereinigter Strictosidinsynthesefractionen nach einer Vorschrift von HEMSCHIEDT (1979) durch Kondensation von 7-³H-Secologanin und Tryptamin hergestellt.

Nach Gefriertrocknung des Rohproduktes und Aufnehmen in Ethanol erfolgte dünnschichtchromatographische Auftrennung auf Kieselgelplatten GF₂₅₄ in Chloroform : Methanol = 4:1. Die eluierte Bande wurde im Laufmittel Ether : Ethanol = 4:1 rechromatographiert.

Das benötigte 7-³H-Secologanin konnte nach NAGAKURA et.al. (1979) aus 7-³H-Secologanol durch Jones-Oxidation dargestellt werden. Für die Überlassung der Vorstufe danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. J. Stöckigt.

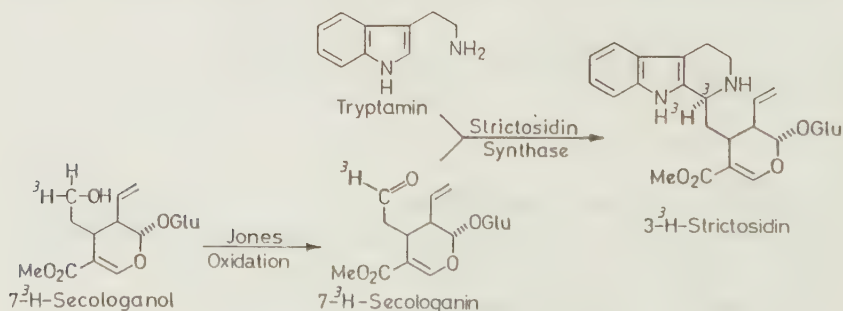


Abb. 5 Jones-Oxidation von 7-³H-Secologanol zu 7-³H-Secologanin und dessen Kondensation mit Tryptamin zu 3-³H-Strictosidin

3. Enzymaktivitätstests

3.1 Strictosidinsynthase

3.1.1 Theoretische Grundlagen

Zur Bestimmung der Strictosidinsynthase-Aktivität wurde der von TREIMER (1979) beschriebene und von SEIPEL (1979) modifizierte Test verwendet. Dieser Test macht sich zunutze, daß bei der Kondensation von spezifisch in 2-Stellung tritiiertem Tryptamin während der Kondensation mit Secologanin zu Strictosidin ein quantitativer Ausbau des Tritiums aus dem umgesetzten Tryptamin erfolgt.

Die Stöchiometrie der Reaktion wurde von TREIMER (1979) eingehend untersucht und steht zweifelsfrei fest.

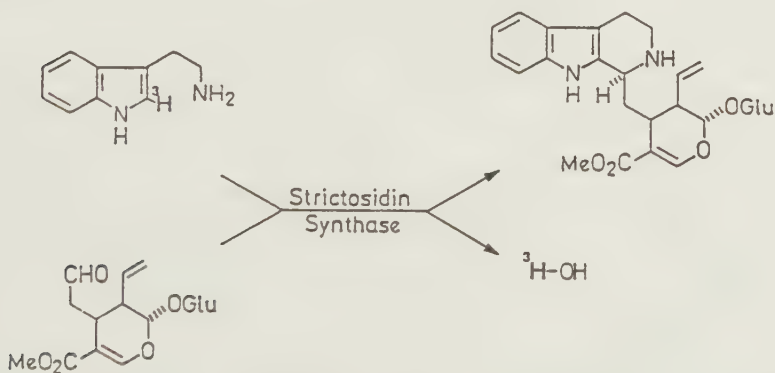


Abb. 6 Reaktionsschema der von der Strictosidinsynthase katalysierten Kondensation von Secologanin und Tryptamin zu Strictosidin

Zur Auswertung des Tests adsorbiert man durch Zusatz einer Aktivkohlesuspension sowohl noch nicht umgesetzte Substrate, wie auch gebildetes Strictosidin an die Kohleoberfläche. Auf Grund der stöchiometrischen Verhältnisse und der hohen Polarität des Wassers bleibt gebildetes tritiiertes Wasser aus-

schließlich in der flüssigen Phase. Durch Zentrifugation können die Kohlepartikel leicht von dieser getrennt werden. Damit verbleibt im Überstand ausschließlich Radioaktivität, die während der Kondensationsreaktion aus umgesetztem Tryptamin freigesetzt wurde. Die gewünschte Meßgröße läßt sich daraus leicht ableiten.

3.1.2 Durchführung des Synthasetests

Der Test wird zweckmäßigerweise in 1.5 ml Eppendorfgefäßen durchgeführt.

Zur Aktivitätsbestimmung pipettiert man:

10 µl	1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5
10 µl	120 mM Secologanin
10 µl	9 mM Tryptaminbisuccinat 14.8 GBq/mol
0 - 70 µl	Probenlösung
ad 100 µl	Aqua bidest.

Zur Bestimmung des Nullwertes verwendet man einen identischen Ansatz ohne Enzym.

Der Reaktionsansatz wird kurz durchgemischt(1), abzentrifugiert(2) und in einem Thermostaten(3) für 60 min bei 37°C inkubiert.

Alle Aktivitätsangaben beziehen sich auf Messungen unter obigen Standardbedingungen.

Der Test wird gestoppt durch Zugabe von 300 µl einer homogenen 4%-igen Aktivkohlesuspension. Nach 10 sec. Durchmischen(1) wird für 5 min abzentrifugiert(2), vom Überstand vorsichtig ein Aliquot von 200 µl pro Test in ein Szintillationsgläschen überführt und mit 5 ml Flüssigszintillator(4) in einem Szintillationszähler(5) gemessen.

(1) z.B. EPPENDORF: Mischer 5432
(2) z.B. EPPENDORF: Zentrifuge 5414
(3) z.B. EPPENDORF: Thermo 5320
(4) z.B. ROTH: Rotiszint
(5) z.B. BERTHOLD: betaszint BF 8000

3.1.3 Auswertung

Zwischen den vom Szintillationszähler gemessenen Zerfällen pro Minute und der Enzymaktivität der Probe besteht folgender Zusammenhang:

C	gemessene Zerfälle / Minute	(cpm)
NW	Nullwert	(cpm)
B	Zerfälle pro Minute	(Bq)
ZR	Zählrate des Szintillationszählers	(%)
VA	Volumenanteil des Probenansatzes der gemessen wurde	(%)
SM	umgesetzte Substanzmenge (hier verbrauchtes Tryptamin)	(mol)
SA	spezifische Aktivität des eingesetzten Substrates	(Bq/mol)
MR	Markierungsreinheit des Substrates (Anteil der Gesamtradioaktivität in Form des gewünschten Substrates)	(%)
RZ	Reaktionszeit	(s)
AT	Aktivität im Testansatz	(kat)
D	Verdünnung der eingesetzten Probe	
VT	Volumen eingesetzter Testlösung	(µl)
VG	Gesamtvolumen der Probenlösung	(µl)
A	Aktivität der Probenlösung	(pkat/µl)
AG	Gesamtaktivität der Probenlösung	(kat)

Unter Verwendung obiger Bezeichnungen läßt sich ableiten:

In der Probe gemessene Radioaktivität:

$$B = (C - NW) \times \frac{100}{ZR} \times \frac{1}{60} \times \frac{100}{VA} \quad (Bq)$$

Die umgesetzte Substanzmenge, die der gemessenen Radioaktivität entspricht:

$$SM = B \times \frac{1}{SA} \times \frac{100}{MR} \quad (mol)$$

Die im Testansatz enthaltene Gesamtenzymaktivität:

$$AT = \frac{SM}{RZ} \quad (\text{kat})$$

Die Enzymaktivität pro Volumen der unverdünnten Probenlösung:

$$A = AT \times \frac{D}{VT} \quad (\text{kat}/\mu\text{l})$$

Nach Einsetzen der obigen Gleichungen ergibt sich folgende Abhängigkeit der Enzymaktivität/Ansatz von der gemessenen Radioaktivität:

$$A = \frac{1}{6} \times \frac{D \times (C - NW)}{VT \times RZ \times ZR \times SA \times MR \times VA} \times 10^5 \quad (\text{kat}/\mu\text{l})$$

Für die Gesamtenzymaktivität der vorhandenen Probenlösung folgt also:

$$AG = A \times VG \quad (\text{kat})$$

Einige der Variablen wurden bei den vorliegenden Messungen im allgemeinen konstant gehalten:

RZ = 3600 s	gleich 1 h
VA = 50 %	entspricht 200 μl von 400 μl
MR = 90 %	ist ein typischer Wert d. h. 90 % der pro Test eingesetzten Radioaktivität sind maximal in Form tritiierten Wassers freisetzbar
ZR = 39 %	galt für den benutzten Zähler ist abhängig vom Gerätetyp und den Be- gleitsubstanzen der Messung und muß durch Eichung ermittelt werden
SA = 14.8 GBq/mol	Wird eingestellt durch Verdünnen tritier- ten Tryptamins mit kaltem Substrat.

Setzt man diese Werte in die obige Formel ein, so vereinfacht sie sich zu dem folgenden Ausdruck für die Strictosidinsyn-
thaseaktivität:

$$A = 1.78 \times 10^{-3} \times D \times \frac{C - NW}{VT} \quad (\text{pkat}/\mu\text{l})$$

3.2 Strictosidinglukosidase

3.2.1 Meßprinzip

Die Bestimmung der Aktivität Strictosidin-spezifischer Glukosidasen erfolgte, mit leichten Modifikationen, nach HEMSCHEIDT (1979).

Der Test beruht darauf, daß die (durch Abspaltung der Glukose) aus dem Strictosidin entstehende Verbindung sich in ihrer Hydrophilie von der Ausgangssubstanz stark unterscheidet. Setzt man radioaktiv markiertes Strictosidin, dessen Markierung nicht im Glukoseanteil liegt, in einen Enzymtest ein, so kann man das unmittelbare Glukosidaseprodukt bzw. daraus entstehende Verbindungen durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln vom nicht umgesetzten Strictosidin abtrennen und durch Messung der Radioaktivität quantifizieren.

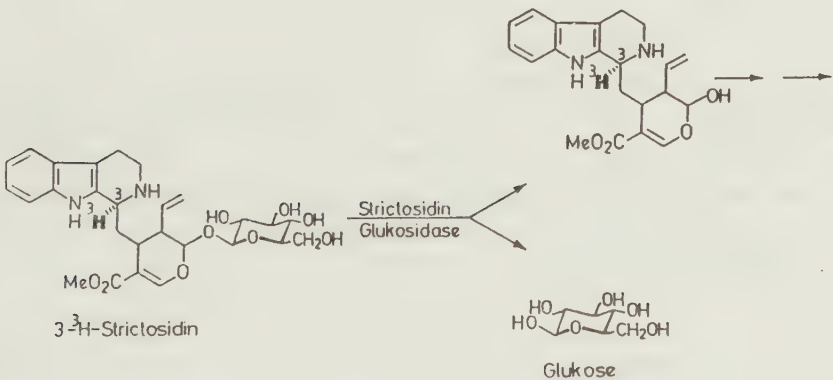


Abb. 7 Reaktionschema der durch die Strictosidinglukosidase katalysierten Reaktion

3.2.2 Arbeitsanleitung

Den Strictosidinglukosidasetest führt man in 2.2 ml Eppendorfgläsern durch. Dazu pipettiert man :

10 µl	1 M Kaliumphosphat pH 6.3
10 µl	0.02 mM Strictosidin (1.85 TBq/mol)
0-80 µl	Probenlösung
ad 100 µl	Aqua dest.

Der Ansatz wird abzentrifugiert(1) und bei 30°C für 30 min inkubiert.

Alle Aktivitätsangaben erfolgen unter der Annahme obiger Reaktionsbedingungen.

Nach Ablauf der Inkubationsdauer stoppt man die Reaktion durch Verdünnen mit eiskaltem Puffer:

400 µl 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.3

Zur Extraktion des entstandenen Aglykons und seiner Folgeprodukte verwendet man:

1 ml Benzol : n-Hexan = 3 : 1

Dazu gibt man die gut verschlossenen Reaktionsgefäße in einen Rundschüttler(2) und extrahiert bei 20 Upm für 45 min bei 4°C. Zur Phasentrennung zentrifugiert(1) man für einige Sekunden. Von der oberen Phase entnimmt man 400 µl und überführt sie in ein Szintillationsgläschen und mißt nach Zusatz von 5 ml Flüssigszintillator (3).

(1) z.B. EPPENDORF: Zentrifuge 5414
(2) z.B. HEIDOLPH: Reax II
(3) z.B. ROTH: Rotiszint

3.2.3 Auswertung

Zur Auswertung der Messung geht man, wie auf Seite 21 beschrieben, vor. Die dort eingeführten Bezeichnungen werden beibehalten.

Es ergibt sich lediglich eine Ergänzung in der ersten Teilformel:

$$\frac{100}{VA} \quad \text{wird ersetzt durch} \quad \frac{100 - VV}{VA}$$

wobei VV Volumenverlust (%) bedeutet.

Von dem zugesetzten Lösungsmittelgemisch geht während der Extraktion ein geringer Anteil (ca 10%) durch Verdunstung verloren, wodurch sich der prozentuale Volumenanteil des für die Messung entnommenen Aliquots erhöht, was dadurch berücksichtigt wird.

Es ergibt sich also folgende allgemeine Formel:

$$A = \frac{1}{6} \times \frac{(C - NW) \times (100 - VV) \times D}{VT \times RZ \times ZR \times SA \times MR \times VA} \times 10^3 \quad (\text{kat}/\mu\text{l})$$

Setzt man für Variablen, die im allgemeinen konstant gehalten wurden, folgende Werte ein,

VA = 40 %	entspricht 400 µl von 1000 µl
MR = 100 %	Die Markierung liegt ausschließlich außerhalb des Glukoseteils
ZR = 39 %	gerätespezifisch (siehe Seite 21)
SA = 1,85 TBq/mol	Läßt sich durch Mischen mit kaltem Strictosidin einstellen
VV = 10 %	Läßt sich minimieren durch striktes Einhalten der Extraktionstemperatur
RZ = 1800 s	entspricht 30 min

so ergibt sich der vereinfachte Ausdruck für die Strictosidinglukosidaseaktivität:

$$A = 2.89 \times 10^{-5} \times D \times \frac{C - NW}{VT} \quad (\text{pkat}/\mu\text{l})$$

3.3 Unspezifische Glukosidasen

3.3.1 Nachweisreaktion

Um unspezifische β -Glukosidasen von Strictosidin-spezifischen zu unterscheiden, wurde, mit verschiedenen Modifikationen, ein Test nach HEMSCHIEDT (1979) verwendet, der auf der Umsetzung des Substratanalogen p-Nitrophenyl- β -Glucosid durch nicht Strictosidin-spezifische Glukosidasen beruht. Dieser Test dient, in Kombination mit dem auf Seite 23 beschriebenen, zur eindeutigen Klassifizierung der untersuchten Glukosidaseaktivitäten.

Der Test auf unspezifische Glukosidaseaktivität läuft in zwei Stufen ab. In der eigentlichen enzymatischen Reaktion wird das Glukosid gespalten. Dabei entsteht in äquimolaren Mengen Glukose und p-Nitrophenol. Nach Ablauf der Inkubationsdauer stoppt man die Reaktion durch Alkalisieren. Dies bringt zum einen die enzymatische Reaktion zum Stillstand, zum anderen wird durch die pH-Verschiebung das gebildete Nitrophenol deprotoniert. Die entstehende ionische Verbindung erscheint farbig auf Grund mesomeriebedingter Verschiebung des Absorptionsmaximums. Auf Grund der Stöchiometrie der Reaktion ist die Menge gebildeten p-Nitrophenols eine geeignete Meßgröße zur Bestimmung der unspezifischen Glukosidaseaktivitäten im Testansatz.

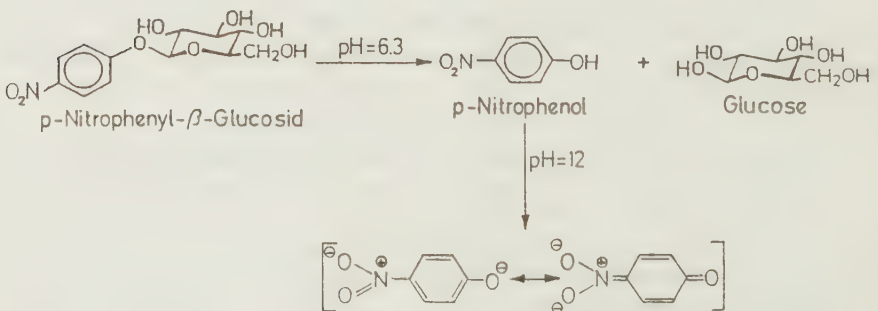


Abb. 8 Reaktionsschema des Tests auf unspezifische Glukosidaseaktivitäten

3.3.2 Durchführung und Auswertung

Der Test läßt sich bequem in Mikrotiterplatten durchführen.

Pro Ansatz pipettiert man:

10 µl	1 M Kaliumphosphat pH 6.3
10 µl	0.9 µM p-Nitrophenyl-β-D-glucosid
0-80 µl	Probenlösung
ad 100 µl	Aqua dest.

Die Testansätze werden mit Parafilm abgedeckt und bei 30°C in einem Brutschrank für 120 bzw. 240 min inkubiert. Danach erfolgt Zugabe von je 100 µl 1 M Natriumcarbonat-Lösung pro Vertiefung.

Die Messung erfolgt photometrisch (1) innerhalb von 5 - 15 min nach Stoppen der Reaktion bei 410 nm.

Der Test wurde meist nur qualitativ verwendet, um die An- oder Abwesenheit unspezifischer Glukosidasen festzustellen. Er kann allerdings auch quantitativ ausgewertet werden, wenn man den bekannten Extinktionskoeffizienten von $18.5 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ (PER-KAMPUS et.al. (1966)) des Produktes zur Berechnung heranzieht und auf die Höhe der durchstrahlten Flüssigkeitssäule in der Mikrotiterplatte umrechnet. Da dies wegen des sich ausbildenden Flüssigkeitsmeniskus für genauere Untersuchungen mit zu großen Fehlern behaftet ist, empfiehlt es sich, eine Eichreihe bekannter p-Nitrophenol-Konzentrationen pro Mikrotiterplatte zu verwenden bzw. die Lösung in normale Küvetten zu transferieren.

(1) DYNATECH, Microplate Reader MR600

4. Proteinpräparative Methoden

4.1 Rohextraktbereitung

Wie bereits aus breit angelegten Screeningprogrammen innerhalb der Pflanzenfamilien der Apocynaceae und Rubiaceae bekannt war (TREIMER (1979); PFITZNER (1984); DEUS (1980)), liegen die Strictosidinsynthase und Strictosidinglukosidase als lösliche Proteine vor. Zur Isolierung wurde deshalb ein Rohextrakt der löslichen Proteinfraction aus dem schockgefrorenen Zellkulturmaterial verwendet.

In diesem Schritt sollen die nicht löslichen Zellwandbestandteile abgetrennt, sowie die erhaltene Proteinlösung schwebstofffrei gemacht werden.

Schockgefrorenes Zellmaterial (vgl. Seite 17) versetzt man im Verhältnis 1 : 1 mit Aufschlußpuffer, rührt bei 0°C, bis eine klumpenfreie Suspension entstanden ist und entfernt durch Filtration und Zentrifugation die unlöslichen Anteile.

Im folgenden werden drei Arbeitsgänge beschrieben, die den jeweils verarbeiteten Gewebemengen angepaßt sind:

1. Analytischer Aufschluß (5 - 20 g Frischgewicht)

- mit gleichem Volumen Aufschlußpuffer homogenisieren
- Zentrifugation bei 20000 g
- z. B. Sorvall RC5B, SS34-Rotor, 15000 Upm, 4°C, 15 min

2. Semipräparativer Aufschluß (50 - 1000 g Frischgewicht)

- mit gleichem Volumen Aufschlußpuffer homogenisieren
- Filtration durch drei Lagen Mull
- Zentrifugation bei 19000 g
- z. B. Sorvall RC5B, GSA-Rotor, 12000 Upm, 4°C, 20 min

3. Präparativer Aufschluß (ab 1000 g Frischgewicht)

- mit gleichem Volumen Aufschlußpuffer homogenisieren
- Filtration durch drei Lagen Mull

- Zentrifugation in einer Durchlaufzentrifuge bei 7500 g und einer Flußrate von 15 ml/min (1)
- Partikelfiltration
Filtration durch zwei Glasfaservorfilter, die in ein Sterilfiltrationsgerät eingelegt werden (2).
- Reduktion der Alkaloidkonzentration
Adsorption der Alkaloide an XAD2 (3)
- Feinstfiltration
25 µm Kartuschenfilter (4)

Der Auslaß der Durchlaufzentrifuge wird über ein Regulierventil(5) mit dem Einlaß des Sterilfilterhalters verbunden, an den die XAD2-Säule (ca. 3 x 15 cm) mit nachgeschalteter Feinstfiltrationskartusche angekoppelt ist.

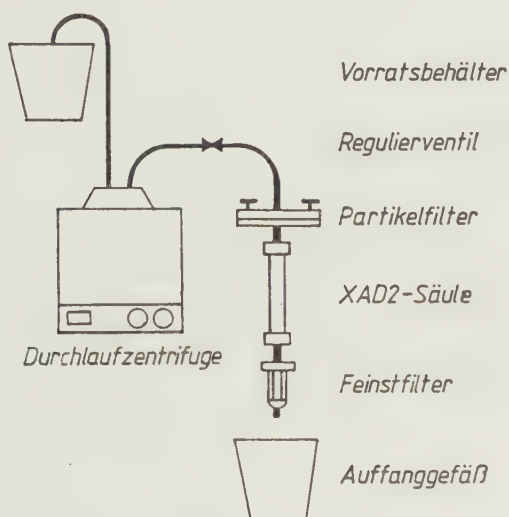


Abb. 9 Geräteanordnung zur Klärung von Rohextrakten im Technikumsmaßstab

- (1) z. B. HERAEUS, Labofuge 15000, 10000 Upm
 (2) SARTORIUS, Göttingen, SM16268 mit 2 x SM13400
 (3) SERVA, Heidelberg, AMBERLITE XAD-2 20-50 pract.
 (4) WHATMAN, Gamma 12, Filterrohr 250
 (5) Quetschhahn nach Hoffmann am Verbindungsschlauch

Das Regulierventil dient zur Einstellung der Durchflußrate. Die hier beschriebene Geräteanordnung läßt sich zur Kühlung bequem in einen handelsüblichen 500 ltr. Kühlschrank einbauen.

Die XAD-Säule ist möglichst klein dimensioniert, um die Proteinadsorption niedrig zu halten und damit Verluste an Enzymaktivität zu vermeiden. Frisches XAD-Material ist zu passivieren (1).

Die abgetrennten Begleitalkaloide des Rohextraktes lassen sich mit Methanol von der Säule eluieren und durch Vakuumdestillation in einem Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreien. Das verbleibende Restwasser kann durch Gefriertrocknung entfernt werden.

Ein Abtrennen der Begleitalkaloide empfiehlt sich nicht nur, weil diese weiterverarbeitet bzw. genutzt werden können, sondern weil sie die Kapazität und Trennleistung der Chromatographiesäulen vermindern. Hinzu kommt, daß zum Regenerieren von Trennsäulen, die mit Alkaloiden "verschmutzt" sind, organische Lösungsmittel verwendet werden müssen, was langwierige Umwaschprozesse zu den sonst benutzten wässrigen Elutionsmitteln bedingt.

Die beschriebene Methode ist bis zu Gewebemengen von 5000 g Frischgewicht erprobt; prinzipiell handelt es sich jedoch um ein kontinuierliches Verfahren und ist nur durch die Standzeit der Filter und das Fassungsvermögen des Rotorkopfes der Durchlaufzentrifuge limitiert.

(1) Dazu wird frisches Adsorbens mit einer verdünnten Proteinlösung für 60 min inkubiert und mit Wasser nachgewaschen. Die preiswerteste Möglichkeit ist eine 1%-ige Milchpulverlösung.

4.2 Ammoniumsulfatfällung

Durch Aussalzen von Proteinen aus ihren Lösungen wird ein Großteil gut wasserlöslicher Stoffe, wie z.B. Alkaloide, abgetrennt und die Proteinfraktion konzentriert.

Fraktionierte Fällungen wurden mit kristallinem Ammoniumsulfat durchgeführt. Versuche haben gezeigt, daß die Verwendung von gemahlenem Ammoniumsulfat keine Vorteile bringt (vgl. COOPER (1981)).

Die Sedimentierung der präzipitierten Anteile erfolgte durch Zentrifugation bei 20000 g (1).

Das Proteinpellet wurde in einem geeigneten Puffer gelöst und zur Entfernung verschleppten Ammoniumsulfats 15 Stunden lang gegen das 100-fache Volumen Aufschlußpuffer dialysiert.

Die Zentrifugationen und auch die Dialyse wurden bei 4°C durchgeführt.

4.3 Ionenaustauschchromatographie

Auf Grund seiner hohen Proteinbindungskapazität pro Milliliter Adsorbens eignet sich DEAE - Säulenmaterial sowohl zur schonenden Konzentrierung großer Mengen Proteinlösung wie auch zur Differenzierung von Proteingemischen nach ihrer Ionenstärke.

4.3.1 Niederdruckchromatographie

Um aus Rohextrakten die Fraktion der sauren Proteine abzutrennen, wurde das Material Cellufine DEAE-AH (2) verwendet, welches die für diesen Einsatzzweck gestellten Anforderungen hervorragend erfüllt:

1. gute Regenerierbarkeit
d.h. pH-stabil, Lösungsmittelinert, volumenstabil
2. hohe Flußraten bei niedriger Kompressibilität
3. Stabilität gegen mikrobielle Verunreinigungen
4. hohe Bindungskapazität pro Milliliter

(1) z.B. Sorvall RC5B, GSA-Rotor, 12000 Upm, 4°C

(2) AMICON, Witten

Zur Chromatographie wurde eine Säule mit niedrigem Durchmesser / Höhe - Verhältnis von 1:4 benutzt.

Säule : 50 x 200 mm
Puffer A : 25 mM Kaliumphosphat pH 6.5
Puffer B : 25 mM Kaliumphosphat pH 6.5
 1 M Natriumchlorid
Flußrate : 5 ml/min
Gradient : Stufengradient
 Nach Aufpumpen der Proteinlösung wird mit Puffer A nachgewaschen, bis im Durchfluß kein Protein mehr nachweisbar ist.
 Dann wird mit Puffer B eluiert, bis die Extinktion bei 280 nm auf 10% des Maximums gefallen ist.
Kapazität : 3 g Protein (1)
Detektion : Fraktionierung der Eluate und Messung der Extinktion bei 280 nm
Ausbeute : mehr als 90 % der Aktivität der untersuchten Enzyme konnten zurückgewonnen werden.
Temperatur : 4 - 8°C
Regenerierung : Mit fünf Säulenvolumen 0.1 N NaOH waschen und mit Aufschlußpuffer reäquilibrieren.

4.3.2 Ionenaustausch - HPLC

Zur Auftrennung von Proteinfractionen nach ihrer Ionenstärke wurden HPLC-Säulen mit DEAE=SP500 Material(2) verwendet. Dieses Material hat zwar im Vergleich mit DEAE-Materialien anderer Hersteller nur eine bescheidene Kapazität, zeichnet sich dafür aber durch außerordentliche Robustheit aus. Die verwendete Korngröße von 20 - 40 µm führt zu einer Verringerung der aktiven Oberfläche, was ebenfalls eine Kapazitätsverminderung bedeutet, dafür liegt der Gegendruck einer 10 mm Säule bei Flußraten bis zu 3 ml/min unter 20 bar.

-
- (1) Dieser Wert liegt deutlich unter den Angaben des Herstellers, höhere Beladungen führen aber zu Verlust an Enzymaktivität.
(2) SERVA, Heidelberg

Es hat sich gezeigt, daß die Aktivitätsausbeute der untersuchten Enzyme bei mehr als 50 bar Druck des Elutionsmittels stark abnahm, was wahrscheinlich auf die hohen Scherkräfte, die auf die Proteinklösung innerhalb der Säule wirken, zurückzuführen ist.

Die verwendete Anlage besteht aus folgenden Komponenten:

Chromatographieausstattung

Pumpen	:	GILSON Model 303 HPLC Pump
Druckkomp.	:	GILSON Model 803 LE Manometric Modul
Mischkammer	:	GILSON Dynamic Gradientmixer
Probenventil	:	RHEODYNE 7125 Injector
Detektor	:	GILSON Model 111 LC Detector
Fraktionskoll.	:	GILSON Model 201 Fractioncollector
Steuereinheit	:	APPLE II - Computer
		GILSON Model 604 Interface
Registrierung	:	LINEAR Versagraph 800 Recorder

Säulenmaterial

Vorsäule	:	Synchropak ASC (1)
Trennsäule	:	DEAE-SP500 10 x 250 mm (2)

Alle Laufmittel wurden unter Vakuum entgast.

Die Niederdruckseiten der Pumpen waren mit 5 µm Edelstahlsinterfritten zur Feinstfiltration der Laufmittel versehen.

4.4 Gelpermeationschromatographie

Das Chromatographiesystem bestand aus folgenden Komponenten:

Geräte:	Pumpe	:	LKB 2150 HPLC Pump
	Probenventil	:	RHEODYNE 7125
	Detektor	:	LKB 2158 Uvicord SD
	Schreiber	:	LKB 2210 Potentiometric Recorder
	Fraktionskoll.	:	GILSON Model 201
	Thermostat.	:	LKB MaxiColdLab

(1) SYNCHROM, Linden, Indiana

(2) Die Säulen für die DEAE-Chromatographie wurden uns freundlicherweise von Herrn Dr. Jenny, CIBA-GEIGY AG, Basel, gepackt.

Säulen: Vorsäule	:	UltroPac TSK-Vorsäule G SWP (1)
		analytisch : 7.5 x 75 mm
		präparativ : 21.5 x 75 mm
Trennsäule	:	UltroPac TSK G 3000 SW (1)
		analytisch : 7.5 x 600 mm
		präparativ : 21.5 x 600 mm

Die Laufmittel wurden mit Milli-Q-Wasser (2) angesetzt, bei Raumtemperatur vakuumentgast und anschließend in der Klimakammer bei 6°C aufbewahrt.

Zur Feinstfiltration der Lösungen war die Zulaufseite der HPLC-Pumpe mit einer 5 µm Stahlsinter Zylinderfritte versehen.

Alle mit dem Laufmittel in Kontakt kommenden Verbindungen waren mit Teflonschläuchen ausgeführt.

Die Probenaufgabe mittels des Rheodyneventils erfolgte hinter der Vorsäule, um die Peakverbreiterung möglichst klein zu halten. Deshalb mußten alle Proben unbedingt vollkommen schwebstofffrei sein, was durch Sterilfiltration oder Zentrifugation bei 15000g (3) erreicht wurde.

4.5 Hydrophobe Chromatographie

Chromatographie an Phenyl-Sepharose wurde zur Konzentrierung verdünnter Proteinlösungen unter gleichzeitiger Auftrennung nach ihrer Hydrophilie verwendet.

Chromatographische Ausrüstung:

Pumpe	:	LKB Microperpex
UV-Detektor	:	LKB Uvicord bei 280 nm
Fraktionskoll.	:	LKB Multirac II
Klimakammer	:	LKB MaxiColdLab

(1) Es handelt sich hierbei um Säulen der Firma TOYO SODA, Japan, die die Firma LKB, Gräfelfing vertreibt.

(2) Milli-Q-Water-Purification-System, MILLIPORE

(3) z.B. Sorvall RC5B, SS34-Rotor, 11000 Upm, 10 min

Säule: Dimensionen : 3 x 30 cm
Adsorbens : Phenyl-Sepharose CL-4B (1)
Flußrate : 4 ml/min
Regenerierung : 3 Säulenvolumen 1 % Triton X-100
3 Säulenvolumen Aqua demin.
3 Säulenvolumen 10 % Ethanol
ca. 30 Säulenvolumen Elutionspuffer

Die Proteinlösungen werden mit Natriumchlorid auf eine Salzkonzentration eingestellt, bei der das gesuchte Enzym vollständig an die Phenylsepharose adsorbiert und dann mit salzfreiem Puffer eluiert.

Hydrophobe Proteine bleiben unter diesen Bedingungen auf der Säule. Deshalb muß nach jeder Chromatographie eine Regenerierung durchgeführt werden, um die Kapazität der Säule zu erhalten.

4.6 Affinitätschromatographie

Die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat kann für die sehr spezifische Anreicherung dieses Proteins genutzt werden.

Das Substrat ist im allgemeinen chemisch vollständig charakterisiert, kann also mit exakt definierter Orientierung an einer festen Phase immobilisiert werden.

Insbesondere für Enzyme, die zwei Substrate verknüpfen, bietet sich die Affinitätschromatographie an, da ohne die zweite Substratkomponente in keinem Fall eine Reaktion stattfinden kann. Zur Elution bietet man dieses Substrat in hohem Überschuß in ungebundener Form an. Je nach Affinität und den molaren Verhältnissen verteilt sich das Enzym zwischen fester und flüssiger Phase.

Diese sehr selektive Methode führt zu hohen Anreicherungsfaktoren, beinhaltet jedoch eine prinzipielle Schwierigkeit: Um den Reinigungserfolg zu überprüfen, muß ein Aktivitätstest

durchgeführt werden, bei welchem aber die hohen Substratkonzentrationen des Elutionsschrittes stören.

Folglich muß ein Dialyse- oder Gelfiltrationsschritt eingeschaltet werden, um das Substrat zu entfernen. Dies gelingt jedoch bei hoher Affinität des Enzyms zum Substrat nur unzulänglich.

Gelelektrophoretische Analysen eignen sich besser zur Anreicherungskontrolle, erlauben jedoch nur qualitative und keine quantitativen Aussagen.

Zur Affinitätschromatographie wurden verschiedene Trägermaterialien verwendet, an die Tryptamin über seine primäre Aminogruppe angekoppelt war.

CNBr - aktivierte Sepharose 4B (1)

Epoxyaktivierte Sepharose 6B (1)

CH-Sepharose 4B (1)

Hydroxysuccinimidyl-SP500 (2)

Die Kopplung des Tryptamins erfolgte jeweils nach den Vorschriften des Herstellers. Da es in hohem Überschuß eingesetzt wurde, war ein Absättigen eventueller freier reaktiver Gruppen nicht nötig.

Die Affinitätsgele unterschieden sich im Trägermaterial sowie in Länge und Hydrophilie des "Spacers" zum gekoppelten Tryptamin.

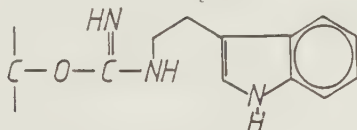
4.7 Immunaaffinitätschromatographie

Für die Immunaaffinitätschromatographie wurden gereinigte IgG-Fraktionen von Kaninchenserum eingesetzt, die an CNBr-aktivierte Sepharose (1) immobilisiert waren. Die Immobilisierungsreaktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

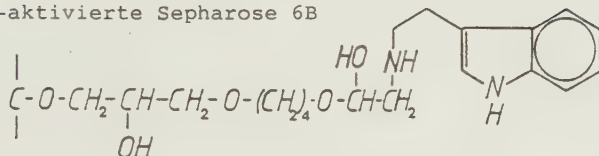
Die Desorption gebundener Proteine erfolgte durch chaotrope Elution oder die Anwendung von pH-Sprüngen.

(1) PHARMACIA, Freiburg
(2) SERVA, Heidelberg

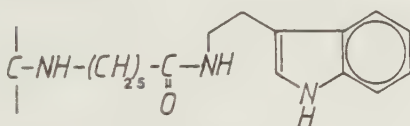
A) CNBr - aktivierte Sepharose 4B



B) Epoxy-aktivierte Sepharose 6B



C) CH - Sepharose 4B / Carbodiimid



D) Hydroxysuccinimidyl=SP500

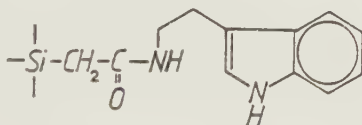


Abb. 10 Chemische Struktur der durch Tryptaminkopplung gewonnen Affinitätsgele

4.8 Ultrafiltration

Für kleine Volumen, die gegebenenfalls unter Pufferwechsel, stark aufkonzentriert werden mußten, kamen Mikroultrafiltrationsgeräte der Marke CENTRIKON (1) zum Einsatz.

Ihr Fassungsvermögen von 2 ml ist ideal, um sie zum Einengen von HPLC-Fractionen zu verwenden.

In einer Sorvall RCSB - Kühlzentrifuge, mit GSA-Rotor bei 4°C und 4500 Upm betrieben, benötigen 2 ml Proteinlösung etwa 1 h bis zur Einengung auf 100 µl.

(1) AMICON, Witten

5. Proteinanalytische Methoden

5.1 Proteinbestimmung

Zur Quantifizierung des Reinigungserfolges in der Proteinanreicherung sind zerstörungsfrei messende photometrische Methoden, die nur die Absorption im UV-Bereich als Berechnungsgrundlage verwenden, nicht sensitiv genug und können durch Begleitstoffe gestört werden. Abhilfe schaffen hier, zumindest was die Nachweisempfindlichkeit betrifft, Farbstests.

Die Bestimmung des Proteingehaltes von Lösungen, die sich überwiegend oder ausschließlich aus einem Protein zusammensetzen, ist allerdings mit relativ großen Unsicherheiten behaftet.

Da für die Reaktionen der Anteil der aromatischen Aminosäuren ausschlaggebend ist, sind die Gehaltsangaben, die durch Messung gegen Referenzproteine ermittelt wurden (üblicherweise wird dafür Rinder Serumalbumin verwendet), neben der Proteinmenge von der Aminosäurezusammensetzung des gemessenen Proteins abhängig.

Diese Information liegt jedoch zum Zeitpunkt der Anreicherung im Normalfall nicht vor.

Proteinmengenangaben in Anreicherungstabellen müssen dementsprechend vorsichtig interpretiert werden. Das gilt natürlich auch für alle abgeleiteten Größen, wie z.B. Anreicherungsfaktoren und spezifische Aktivitäten.

5.1.1 Lowry-Test

Proteinbestimmungen nach der Lowry-Methode wurden in der Modifikation nach BENSADOUN und WEINSTEIN (1976) durchgeführt.

5.1.2 Coomassie-Bestimmung

Parallel zu dem obigen Proteintest wurde, insbesondere für große Probenzahlen, die wesentlich schnellere Methode nach BRADFORD (1976) verwendet.

Der Test wurde für Proteinmengen, die 10 - 100 µg BSA ent-

sprechen, als 5 ml Makrotest und für den Bereich von 1 - 20 µg als Halbmikrotest mit 1.1 ml Testvolumen ausgeführt. Die Messung erfolgte innerhalb von 3 - 15 min nach der Reaktion in Kunststoffküvetten bei 595 nm im Spektralphotometer gegen Reagenzlösung als Referenz.

Coomassie-Reagenz

25 mg SERVA Blau G (1)

50 ml Ethanol (96%)

100 ml Phosphorsäure (85% V/V)

ad 1000 ml Aqua dem.

Makrotest

0 - 200 µl Probe

5 ml Coomassie Reagenz

Halbmikrotest

0 - 100 µl Probe

1 ml Coomassie R.

5.2 Gelelektrophoretische Verfahren

5.2.1 SDS-Gelelektrophorese

SDS-Gele, nach dem System von LAEMMLI und FAVRE (1973), mit 1.5 mm Schichtdicke, wurden zur analytischen Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht benutzt.

Die Färbung der Gele erfolgte mit Coomassie G-250, wie bei COOPER (1981) beschrieben.

Die Proben wurden zur Denaturierung der Proteine vor der Elektrophorese in Auftragspuffer (LAEMMLI (1970)) 5 min bei 100°C gekocht.

Referenzproteine sind kommerziell erhältlich (2) und wurden wie die anderen Proben vorbehandelt.

5.2.2 Isoelektrische Fokussierung in ultradünnen Gelen

Analytische Isoelektrofokussierung ist eine schnelle und sehr sensitive Methode, auch komplexe Proteingemische nach ihren Isoelektrischen Punkten aufzutrennen. Bei Verwendung von

(1) SERVA, Heidelberg: Bei Verwendung von Coomassie-Farbstoffen anderer Hersteller muß eventuell mehr eingesetzt werden

(2) z.B. PHARMACIA oder SIGMA

Fertigfolien erhält man schon 4 Stunden nach Versuchsbeginn das Ergebnis. Außerdem lassen sich trägergebundene Gele hervorragend zur Dokumentation, auch über Jahre hinweg, unverändert aufbewahren.

Analytische Trennungen wurden in ultradünnen Gelen (1) in einer thermostatisierten Flachbettelektrophoresekammer (2) durchgeführt.

Für Trennungen kamen die pH-Bereiche 4-5 und 3-10 zum Einsatz.

Elektrophoresepuffer

Kathodenpuffer (pH 3-10)

0.4 % Arginin-Base

0.6 % Lysin-Base

12 % Ethylendiamin

Kathodenpuffer (pH 4-5)

2.0 % Glycin

Anodenpuffer

0.33 % Asparaginsäure

0.38 % Glutaminsäure

Trennbedingungen

Folgende Parameter wurden für die Trennungen verwendet:

Temperatur	: 8°C
Startspannung	: 200 V
Endspannung	: 1500V (limitiert)
Leistung	: 2 Watt (limitiert)
Endpunkt	: 30 min. nach Erreichen des Spannungslimits

Färbelösungen

- | | |
|--------------------|--------------------------|
| 1. Fixierbad | 20 % Trichloressigsäure |
| 2. Färbebad | 0.04 % SERVA Blau W |
| | 0.4 % Trichloressigsäure |
| 3. Entfärbebad | 0.2 % Trichloressigsäure |
| 4. Neutralisierbad | 0.02 % TEMED |

(1) SERVA, Heidelberg: Servalyt Precotes

(2) LKB, Gräfelfing : Multiphor - Elektrophoresekammer
Macrodrive 5 Spannungsquelle

HAAKE, Karlsruhe : Haake C + Haake F3 Badthermostat

Färbeprozedur

Nach Beendigung der Elektrophorese entfernt man die Auftrags-
taschen und Elektrodendochte. Danach erfolgt die Detektion nach
folgendem Schema:

- 15 min Fixierbad
- 10 min Färbebad
- 30 min Entfärbebad (3 mal 10 min bei Badwechsel)
- 10 sec wässern in Aqua dem.
- 10 sec Neutralisierbad (bis Färbung violett)

Die Zeit für Wässern und Neutralisieren darf nicht überschrit-
ten werden, sonst kommt es zu signifikantem Verlust an Sensiti-
vität.

Die entwickelte Folie läßt man an der Luft trocknen.

Die Probenvolumen betragen maximal 20 µl, die Proteinmenge
sollte 40 µg pro Spur nicht übersteigen.

Als Referenz wurde auf allen Gelen mindestens in einer Spur
10 µl einer 3%-igen Lösung einer Proteintestmischung nach
RADOLA (1973) (1) aufgetragen.

5.3 Aminosäureanalyse

Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung erfolgte nach
Totalhydrolyse des Proteins. Wegen der unterschiedlichen Stabi-
lität der einzelnen Aminosäuren gegenüber den Reaktionsbedin-
gungen muß der Gehalt instabiler Aminosäuren (Threonin, Serin)
durch Extrapolation der Analysenergebnisse aus Ansätzen mit
unterschiedlichen Reaktionszeiten ermittelt werden.

Zur Probenvorbereitung ist einheitlich 1.0 nmol des Proteins in
ein Hydrolyseröhrchen (2) zu überführen und im Vakuum zu trock-
nen (3).

-
- (1) identisch mit SERVA, Proteintestmischung 9
 - (2) Fiolax 2771, 100 x 10 mm
 - (3) SAVANT, Speed Vac Concentrator

5.3.1 Standardhydrolyse

(ohne Bestimmung von Cystein und Tryptophan)

200 µl Hydrolysereagenz (6 N HCl mit 0.1 % Phenol und 0.1 % Thioglykolsäure) zusetzen, evakuieren, zuschmelzen und je einen Ansatz für 24 h, 48 h und 96 h auf 110°C temperieren.

Das Hydrolysat abzentrifugieren, im Vakuum trocknen (2) und in 50 µl Startpuffer des Aminosäureanalysators aufnehmen.

Asparagin und Glutamin werden zu ihren Säuren desaminiert und zusammen mit diesen summarisch bestimmt.

Durch Extrapolation der Ergebnisse der verschiedenen Hydrolyseansätze auf 0 h Hydrolysedauer können von Threonin und Serin, durch Extrapolation auf unendliche Hydrolysedauer können von Valin, Isoleucin und Leucin die exakten Werte ermittelt werden (GLAZER et.al. (1982)).

Cystein und Tryptophan werden zerstört und müssen getrennt bestimmt werden.

5.3.2 Tryptophanbestimmung

200 µl 4 N Methansulfonsäure mit 0.1 % Tryptamin zusetzen, evakuieren, zuschmelzen und für 24 h bei 110°C hydrolisieren. Die Probe mit 8 M NaOH auf pH 2.2 einstellen (1), zentrifugieren und 50 µl für die Aminosäureanalyse einsetzen (LIU u. CHANG (1971)).

Durch den hohen molaren Überschuß an Tryptamin wird einer chemischen Zerstörung des Tryptophans vorgebeugt. Bei der Aminosäuretrennung durch Ionenaustauscher ist es jedoch leicht von Tryptophan zu unterscheiden.

5.3.3 Cysteinbestimmung

In 200 µl Ameisensäure / Methanol (4 : 1) das Protein aufnehmen und auf -8°C kühlen. 50 µl Perameisensäure zusetzen und zwei Stunden bei -8°C reagieren lassen und danach lyophilisieren (MOORE (1963)). Die Probe in 50 µl Startpuffer des Aminosäureanalysators aufnehmen.

(1) Das ist der Start pH-Wert des verwendeten Aminosäureanalysators

Perameisensäure spaltet Cystin oxidativ zu Cysteinsäure; in dieser Form wird es im Aminosäureanalysator nachgewiesen.

5.3.4 Auftrennung der Aminosäuregemische

Zur Trennung und Quantifizierung der Aminosäuren wurde ein BECKMANN M121 - Aminosäureanalysator mit angeschlossenem Integrator (1) verwendet.

Die Analyse erfolgt durch Trennung der Aminosäuren an einer Ionenaustauschersäule, Derivatisierung mit Ninhydrin und simultaner photometrischer Detektion bei 570 und 440 nm.

Als Referenz für die Auswertung bedient man sich der Analyse eines Testgemisches, das je 1 nmol aller Aminosäuren enthält.

Herrn Prof. Dr. K. Beyreuther, Institut für Genetik, Köln, danke ich herzlich für die Zurverfügungstellung der Einrichtungen, seine Betreuung und stete Gastfreundschaft.

Herrn Dipl. Biol. G. Multhaupt gilt mein Dank für seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

5.4 Kohlenhydratanalyse

5.4.1 Glykoproteinnachweis mit Schiff's-Reaganz

Zum Nachweis von Glykoproteinen diente die Reaktion der Zucker mit Schiff's-Reaganz. Für die Analyse niedriger Proteinmengen wurde diese Methode an die Arbeit mit Ultradünnschichtgelen angepaßt.

Arbeitsanleitung

1) Proteintrennung

Auftrennung des Proteingemisches durch Isoelektrofokussierung, jedoch ohne Fixier- oder Färbeschritte.

2) Fixieren

10 min in 20% TCA fixieren und 10 sec in fließendem Aqua dem. wässern.

(1) SPECTRA PHYSICS, Darmstadt: SP4200 Integrator

3) Perjodsäurespaltung

Gel in eiskalter 7.5%-iger Essigsäure 5 min inkubieren.
Danach 5 min in 0.2% Perjodsäure bei 4°C inkubieren.

4) Anfärben mit Schiff's-Reagenz

Gel ohne Zwischenwässern sofort in eiskaltes Schiff's-Reagenz (1) überführen und 10 min im Dunkeln inkubieren (2).

5) Entfärben

Zum Entfärben mehrmals mit eiskalter 10%-iger Essigsäure für 5 min waschen.

Positive Reaktion wird durch deutliche Lilafärbung angezeigt, die sich am Tageslicht und beim Trocknen des Gels an der Luft noch verstärkt.

Stellt man erst zu spät fest, daß der Hintergrund zu intensiv gefärbt ist, kann das Gel nochmal wie oben entfärbt werden.

5.4.2 Quantifizierung des Kohlenhydratanteils mittels

Anthron - Test

Um den Kohlenhydratanteil des Enzyms zu quantifizieren, wurde der von SPIRO (1966) beschriebene Anthron-Test modifiziert und an die zu analysierenden geringen Proteinmengen angepaßt.

Es sind jedoch keine Hexosamine damit nachweisbar.

Zur Eichung des Testverfahrens wurden Proteine verwendet, von denen die exakte Charakterisierung des Kohlenhydratanteils vorlag.

Anthron-Reagenz

180 ml H₂SO₄ konz.

125 mg Anthrone auflösen, abkühlen lassen

2.5 g Thiourea und kühl lagern

70 ml Aqua dem.

(1) Schiff's-Reagenz ist gebrauchsfertig erhältlich
z.B. MERCK, Darmstadt

(2) Auf Lichtausschluß ist streng zu achten, sonst erhält man falsch positive Resultate.

Testansatz

0 - 200 µl Probenlösung

1 ml Anthronreagenz

mischen und für 15min auf 95°C erhitzen

abkühlen lassen und nach 20 min bei 620 nm in Halbmikroküvetten gegen einen Leerwert ohne Protein und Kohlenhydrat messen

Eichproteine

1) Glukoseoxidase (1)

Die Analyse des Kohlenhydratanteils ist PAZUR et.al. (1965) entnommen:

16 % Carbohydratanteil, der sich wie folgt zusammensetzt:

	mg/100mg Enzym	Anzahl/Enzymmolekül
D-Mannose :	13.9	128
D-Glucosamin :	2.0	19
D-Galactose :	0.3	3

2) Meerrettichperoxidase (2)

Der Kohlenhydratanteil setzt sich wie folgt zusammen:

(GOTTSCHALK (1972))

16 % Zucker (Galaktose, Arabinose, Mannose)

1.9 % Aminosucker (Mannosamin)

5.4.3 Bestimmung der Zuckerkomponenten

Kohlenhydratanteile wurden nach Totalhydrolyse des Proteins und Derivatisierung der freigesetzten Zucker gaschromatographisch identifiziert und quantifiziert (JORDAN (1985)).

Herrn Dr. E. J. Jordan, Institut für Pharmazeutische Biologie, München, danke ich für die Durchführung der Analysen.

(1) SERVA, Heidelberg: Glukoseoxidase, lyophilisiert, research grade, Best.-Nr.: 22738

(2) SIGMA, Taufkirchen: Meerrettichperoxidase Type VI

Totalhydrolyse

(mind. 100 µg Kohlenhydrat in die Analyse einsetzen)

Protein in 2 N Trifluoressigsäure auflösen

1.5 h bei 120°C hydrolisieren

Die Probe am Rotationsverdampfer trocknen

Derivatisierung

in 100 µl 1 M Ammoniak aufnehmen

1 ml 2%-iges NaBH₄ in DMSO zusetzen

90 min bei 40°C im Wasserbad inkubieren

100 µl Essigsäure zusetzen

(Zerstören des überschüssigen NaBH₄)

2 ml Acetanhydrid und 200 µl 1-Methylimidazol zufügen

(Acetylierung der entstandenen Polyole)

nach 15 min die Reaktion durch Zusatz von 20 ml eiskaltem Wasser abstoppen

Nach weiteren 15 min werden die Alditolacetate mit Dichlormethan extrahiert. Die Unterphase wird direkt zur GC-Analyse verwendet.

Zur quantitativen Auswertung benutzt man die Methode des internen Standards. Der Probenlösung wird ein Testgemisch bekannter Konzentration aller nachweisbaren Zuckerderivate zugesetzt und für die Berechnung als Standard herangezogen.

GC-Analyse

Geräte :	Perkin-Elmer 900
Trägergas :	Argon
Flußrate :	30 ml/min
Detektor :	FID
Temperatur:	Detektor u. Einspritzblock : 250°C
	Säule : 225°C isotherm
Säule :	GP 3% SP-2330 auf 100/120 Supelcoport

5.4.4 Nachweis von Aminosukcern

Mit dem im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Verfahren sind keine Aminosucker nachweisbar.

Bei der konventionellen Aminosäureanalyse erhält man jedoch gleichzeitig auch die Aminosäureanteile, da diese nach denselben Kriterien getrennt werden können. Ein Problem bilden Aminosäuren, die mit Aminosäuren koelutieren. Eine Differenzierung kann durch chemische Derivatisierung der Aminosäuren erreicht werden.

Zur quantitativen Auswertung werden Standards der in Frage kommenden Aminosäure benutzt.

5.5 Gelpermeationschromatographie

Bei Glykoproteinen wird durch SDS-Gelelektrophorese nicht das richtige Molekulargewicht ermittelt. Gelpermeationschromatographie stellt für diese Proteinklasse das zuverlässigste Verfahren für dessen Bestimmung dar.

Die verwendete Anlage ist mit der auf Seite 34 beschriebenen identisch.

Bei der Molekulargewichtsbestimmung ist darauf zu achten, daß das Volumen der Probe möglichst klein gehalten (mit 50 bis 200 µl erhält man gute Ergebnisse) und die verwendete Probenschleife diesem angepaßt wird.

Zur Eichung dienen Proteine bekannter Molekulargewichte.

6. Enzymimmobilisierungen

6.1 Charakteristika der Trägermaterialien

Zur Enzymimmobilisierung über primäre Aminogruppen wurden verschiedene organische und anorganische Träger mit unterschiedlicher Aktivierung verwendet.

Materialien und ihre Bezugsquellen

A)	CNBr - aktivierte Sepharose 4B	:	PHARMACIA
B)	Epoxy - aktivierte Sepharose 6B	:	PHARMACIA
C)	Hydroxysuccinimidyl = SP500	:	SERVA
D)	Controlled-Pore Glass	:	SIGMA

Struktur und Aktivierung

	<u>Träger</u>	<u>Aktivierung</u>	<u>Struktur</u>
A)	Sepharose	CNBr	$\begin{array}{c} \\ \text{C}-\text{O}-\text{C}\equiv\text{N} \\ \end{array}$
B)	"	Epoxy	$\begin{array}{c} \\ \text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-\underset{\text{O}}{\text{CH}}-\text{CH}_2 \\ \end{array}$
C)	Silikat	Hydroxysuccinimid	$\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{CH}_2-\underset{\text{O}}{\text{C}}-\text{O}-\text{N} \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array}$
D)	"	Alkylamin + Glutardialdehyd	$\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2 \end{array} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array} \text{RN}=\text{C}=\text{N}$

Charakteristika

	<u>Träger</u>		<u>Spacer-</u>	<u>Bindungstyp</u>	<u>Kopplungs</u>
	<u>organ.</u>	<u>anorgan.</u>	<u>länge</u>		<u>pH-Wert</u>
A)	+		2	Isoharnstoffbdg.	8.3
B)	+		12	Alkylamin	9
C)		+	3	Säureamid	9
D)		+	7	Schiff'sche Base	7

6.2 Kopplungsprozeduren

A,B + C : Nach den Angaben des jeweiligen Herstellers
D : nach WEETALL (1976)

7. Immunologische Verfahren

7.1 Antikörpergewinnung

Enzympräparationen für die Immunisierung von Kaninchen wurden gegen PBS dialysiert und auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt.

Für die Injektionen wurde die Proteinlösung mit dem gleichen Volumen FREUND'sches Adjuvanz komplett versetzt und durch kurzes Beschallen mit Ultraschall (3 x 3 sec) emulgiert (1).

(1) BRANSON, Sonifier S 125

Die Immunisierung erfolgte nach folgendem Schema:

Kontrollserum abnehmen

Vor der ersten Injektion Blut abnehmen.

Das gewonnene Serum dient als Kontrollserum.

Vorimmunisierung

1. - 4. Woche je 100 µg Antigen subkutan

5. Woche Pause

Antiserengewinnung

6. Woche 200 µg Antigen intramuskulär
(Boosterinjektion)

7. Woche Blutabnahme (aus der Ohrvene)

8. Woche Blutabnahme

9. Woche Pause

Der Zyklus der Antiserengewinnung wird etwa 6-mal wiederholt.

Die Seren wurden nach dem Gerinnen vom Blutkuchen durch Zentrifugieren getrennt und eingefroren gelagert:

Gerinnen	:	2 h Raumtemperatur
		12 h bei 4°C
Zentrifugieren	:	12000 g, 10 min, 4°C (1)
Lagerung	:	bei -20°C

Für die Durchführung der Immunisierung und die Serengewinnung danke ich Frau E. Schecklies.

7.2 Isolation der Immunglobulin Fraktion

Die Isolation der IgG - Fraktion aus den Kaninchenserum wurde nach der Vorschrift von HURN u. CHANTLER (1980) vorgenommen.

Die IgG - Präparationen wurden jedoch nicht lyophilisiert, wie dort beschrieben, sondern in Tris-Puffer bei -20°C in kleinen Aliquots gelagert.

(1) SORVALL SS-34 Rotor, 10000 Upm

8. Proteinsequenzierung

8.1 Proteolytische Spaltungen

Zur Sequenzanalyse eines Proteins ist es meist notwendig Fragmente davon herzustellen, die durch reproduzierbare, sequenzspezifische Spaltung entstehen.

Die enzymatische Proteolyse mit Trypsin ist eine geeignete Methode.

Arbeitsanleitung zur tryptischen Spaltung von Proteinen:
(vgl. BEYREUTHER (1975))

1. Hitzedenaturierung

- 1 - 10 nmol Protein in 200 µl Aqua bidest. aufnehmen
- 15 min bei 110°C inkubieren

2. Carboxymethylierung von Cystein

- Proteinlösung einstellen auf: 0.5 M Tris/HCl pH 8.0
2 mM EDTA
8 M Harnstoff
- Zusatz des 500-fachen molaren Überschusses DTE
- Inkubieren bei 50°C für 30 min
- Zusatz des 1000-fachen molaren Überschusses Jodacetamid
- 20 min unter Lichtausschluß reagieren lassen
- Dialyse gegen 50 mM Ammoniumbicarbonat-Puffer pH 8.0 (1)

3. Proteolyse

- TPCK-Trypsin (2) zusetzen
molares Verhältnis Trypsin : Protein = 1 : 20
- 12 h bei 37°C inkubieren
- Lyophilisieren (3)

Die so erhaltenen Peptidgemische wurden zur Isolierung einzelner Peptide verwendet.

-
- (1) Ammoniumhydrogencarbonat: FLUKA, purum p.a.
Ammoniak 25% : MERCK, suprapur
Milli-Q-Wasser: Milli-Q Water Purification System,
MILLIPORE
- (2) MERCK: Trypsin TPCK-behandelt, Best.-Nr. 24581
- (3) z.B: Speed Vac Concentrator, SAVANT, Hicksville

8.2 Auftrennung von Peptidgemischen

Zur Auftrennung von Peptidgemischen und zur Isolierung einzelner Peptide wurde Reversed-Phase-HPLC eingesetzt (vgl. STÜBER und BEYREUTHER (1981)).

Das verwendete HPLC-System bestand aus folgenden Komponenten:

Pumpe	: HPLC-Pumpe 8800	DuPont
Säulenofen	: ThermoCabinet 8000	DuPont
Detektor	: UV-Spektralphotometer	DuPont
Steuereinheit	: Gradient Controller 8800	DuPont
Integrator	: Integrator SP 4100	Spectra Physics
Säule	: BakerBond RP8 4.1 x 250 mm	

Folgende Laufmittel wurden verwendet:

Komponente A	: 0.1% Trifluoressigsäure (1)
Komponente B	: 0.1% Trifluoressigsäure 60% Acetonitril (2)

Die Laufmittelkomponenten wurden mit Milli-Q-Wasser angesetzt und mit Helium entgast.

8.3 Mikrosequenzierung

Die Sequenzanalyse isolierter Peptide wurde mit Hilfe eines Gas-Flüssig-Festphasen-Sequenzanalysators (3) an der Universität Köln von Herrn Prof. Dr. K. Beyreuther, Institut für Genetik, durchgeführt, wofür ich mich herzlich bedanken möchte.

Außerdem danke ich Herrn Dr. Lottspeich, Genzentrum München, für die Sequenzierung einiger Peptide nach dem gleichen Verfahren.

Dieser Sequenatortyp liefert Phenylhydantoin-Derivate der Aminosäuren, im weiteren als PTH-Aminosäuren bezeichnet.

(1) PIERCE: HPLC/Spectro Grade - Sequanal Quality
(2) MERCK: Lichrosolv
(3) APPLIED BIOSYSTEMS: Modell 470 A

8.4 PTH-Aminosäureanalyse

Die vom Gasphasensequenator erhaltenen PTH-Aminosäuren müssen nach Derivatisierung noch identifiziert werden. Dies erfolgt durch HPLC-Trennung.

Die Fraktionen des GPS werden in einem SpeedVac Concentrator lyophilisiert, in 100 µl 2 M methanolischer Salzsäure gelöst und für weitere fünf Minuten bei 40°C im SpeedVac Concentrator getrocknet. Danach werden die Proben in 50 µl Methanol aufgenommen und zur Analyse verwendet.

Während der Derivatisierung reagieren die PTH-Aminosäuren PTH-Asp und PTH-Glu zu ihren Methylestern.

Das verwendete Chromatographiesystem bestand aus folgenden Komponenten:

Geräte:

Probengeber	: WISP 710A	Waters
Pumpe	: 2150 HPLC Pump	LKB
Photometer	: 2151 Photometer mit 2 µl Zelle	LKB
Auswerteeinheit	: Trilab Model II	SES
Plotter	: SES 2022	SES

Säulen:

Vorsäule	: ETH-Vorsäulenmaterial	DuPont
Trennsäule	: Zorbax-CN 4.6 x 250 mm	DuPont

Laufmittel:

Puffer A	: 10 - 30 mM Natriumacetat pH 4.2
Puffer B	: 71.4 % Tetrahydrofuran 20.0 % Acetonitril 8.6 % Methanol
Elutionsmittel	: Puffer A : Puffer B = 2 : 1

Flußrate	: 1.25 ml/min
Detektion	: 269 nm

Die Laufmittelkomponenten wurden mit Milli-Q-Wasser hergestellt und mit Helium entgast.

Die Injektionsvolumen wurden in Abhängigkeit von der Substanzmenge im Bereich von 5 - 40 µl gewählt.

Die Zusammensetzung des Elutionsmittels muß dem Alter der Säule angepaßt werden. Mit zunehmendem Alter der Trennsäule muß die Molarität von Puffer A erhöht werden, um die sich erhöhenden Retentionszeiten von PTH-Arg und PTH-His zu kompensieren.

9. Oligonukleotide

9.1 Synthese

Oligonukleotidgemische synthetisierte uns freundlicherweise Herr Dr. Merz, Genzentrum München, auf einem DNA-Synthesizer der Firma APPLIED BIOSYSTEMS nach der Phosphotriestermethode.

9.2 Reinigung

Um bei Hybridisierungen die Hintergrundschwärzung zu vermindern, mußten die Oligonukleotide gewünschter Länge von kürzeren Fragmenten und anderen im Rohprodukt enthaltenen Begleitsubstanzen, wie z. B. Schutzgruppen, abgetrennt werden. Dazu wurden gelelektrophoretische Methoden verwendet.

9.2.1 Elektrophoretische Auftrennung

Zur Auftrennung des Rohproduktes der Oligonukleotidsynthese wurde ein hochprozentiges denaturierendes Polyacrylamid/Harnstoff-Gel bei 45°C Betriebstemperatur verwendet.

Lösungen:

PA-Mix	:	38	g	Acrylamid p. a. (4x krist.)
		2	g	N,N'-Methylenbisacrylamid
		ad 100 ml Aqua bidest.		
10xTBE	:	108	g	Trisbase
		55	g	Borsäure
		20	ml	1 M EDTA (pH 8.0)
		ad 1000 ml Aqua bidest.		
		einstellen auf pH 8.0		

Das zusammengesetzte Plattenpaket wird mit Isolierband abgedichtet und für eine Stunde gekühlt, um den Polymerisationsstart der Gellösung etwas zu verzögern.

Für die Probestaschen wird ein Plexiglaskamm mit circa 5 mm breiten Zähnen verwendet.

Zum Gießen des Geles hat es sich als gut erwiesen, den Plattenstapel etwa im Winkel von 30 Grad schräg auf eine ebene Unterlage zu legen und in dieser Stellung die Gellösung einzufüllen. Dadurch vermindert sich der hydrostatische Druck auf die Plattenabdichtung, was Undichtigkeitsproblemen vorbeugt.

Geldimensionen : 1 x 180 x 400 mm

Gelherstellung : 40 ml PA-Mix

10 ml 10xTBE

12.5 ml Aqua bidest.

50 g Harnstoff p.a.

Nach vollständigem Lösen, eventuell unter leichtem Erwärmen, wird die Gellösung durch ein Glasfaserfilter gesaugt und anschließend 10 min unter Vakuum entgast.

Unmittelbar vor dem Gießen des Gels werden zugesetzt:

45 µl TEMED
100 µl 10 % Ammoniumperoxodisulfat

Elektrophorese : Laufpuffer : 1xTBE (Kathode u. Anode)

Spannung : 800 V

Laufzeit : 6 h

Marker : 0.25 % Bromphenolblau reinst
0.25 % Xylencyanol FF pract.
30 % Glycerin p.a.

Apparatur : Die verwendete Apparatur ist von den Werkstätten der Universität München hergestellt und entspricht den bekannten Sequenzgelapparaturen.

Glasplatten: 4 mm Float-Glas

Spannungsquelle: LKB Macrodrive 5

Vor der elektrophoretischen Auftrennung der Oligonukleotide ist eine Präelektrophorese von circa 1 Stunde durchzuführen. Unmittelbar vor dem Probenauftrag die Geltaschen unbedingt gut spülen, um Verzerrungen der Probenfront zu vermeiden.

9.2.2 Detektion und Elution

Da Oligonukleotide nicht mit Ethidiumbromid detektiert werden können, mußte zu deren Nachweis eine andere Methode verwendet werden. Einzelsträngige DNA zeigt ein Absorptionsmaximum bei 258 nm. Diese Wellenlänge stimmt gut mit der 254 nm Quecksilberlinie überein. Bestrahlt man ein Polyacrylamidgel, das Oligonukleotide enthält, mit 254 nm, so wird die Absorption der Strahlung sowohl vom Polyacrylamid wie auch von den Oligonukleotidbanden herrühren. An den Stellen der DNA-Banden addieren sich die Absorption des Gels und der Nukleotide.

Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. Fluorescein-Na, absorbieren Licht im UV-Bereich und reemittieren bei höheren Wellenlängen, hier z.B. im Gelbgrünen. Für Licht im sichtbaren Bereich hat das Polyacrylamidgel aber einen vernachlässigbaren Extinktionskoeffizienten.

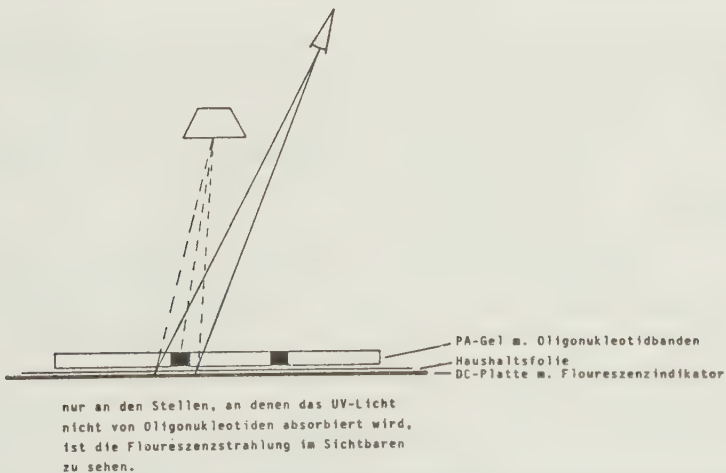


Abb. 11 Methode zur Detektion unmarkierter Oligonukleotide in Polyacrylamidgelen

Legt man unter das mit 254 nm bestrahlte Oligonukleotid-haltige Gel eine mit Fluoreszenzindikator imprägnierte DC-Platte, so wird an den Stellen der Fluoreszenzfarbstoff nicht angeregt, wo Oligonukleotide die UV-Strahlung absorbieren. In der Aufsicht sieht man also an allen Stellen das hellgrüne Licht der reemittierten Strahlung, wo keine DNA im Gel vorliegt.

Die oberste Oligonukleotidbande wird ausgeschnitten, das Gelstück möglichst fein zerstoßen und in einem Eppendorfgefäß mit 1 ml TE-Puffer für 3 - 6 h inkubiert. Da Oligonukleotide nur ein niedriges Molekulargewicht (z.B. 20-mer ca. 6500 Dalton) haben, ist die Ausbeute der Diffusionsextraktion gut. Die Gelkrümmel werden abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Sediment extrahiert man nochmals mit der gleichen Menge TE-Puffer.

Da die wiederholte Extraktion ein relativ großes Volumen zur Folge hat und überdies der Gehalt an Harnstoff, welcher viele Enzyme inhibiert, hoch ist, schließt man einen DEAE-Chromatographieschritt an. Dabei wird der ungeladene Harnstoff abgetrennt und die Oligonukleotide aufkonzentriert.

Eine sterile Pasteurpipette mit einem kleinen Stopfen silikonisierter Glaswolle wird mit 500 µl sterilem DEAE-Material(1) gefüllt und mit TE-Puffer äquilibriert. Anschließend gibt man die erhaltenen oligonukleotidhaltigen Extraktionsüberstände über die Säule, wäscht mit 5 Säulenvolumen TE-Puffer nach und eluiert mit 2 Säulenvolumen TE-Puffer, der 1 M Natriumchlorid enthält, die gebundenen Oligonukleotide.

Von der erhaltenen Fraktion wird die Oligonukleotidkonzentration bestimmt. Eine Abtrennung des Natriumchlorids ist im allgemeinen nicht nötig. Die Konzentration der gereinigten Oligonukleotide sollte so hoch sein (größer als 0.1 µg/µl), daß die eingesetzten Volumina Kinasierungsansätze in ihren Salzkonzentrationen praktisch nicht beeinflussen.

(1) WHATMAN, DE52-Material, autoklaviert in TE-Puffer

9.2.3 Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung der Oligonukleotide wurde ein UV-Spektrum des Bereichs 220 - 320 nm herangezogen. Für die Auswertung wurde zugrundegelegt:

1 O.D. 260 nm entspricht 20 µg/ml

(vgl. MANIATIS et.al. (1982))

10. Präparation pflanzlicher m-RNA

10.1 Vorbehandlung von Geräten und Glaswaren

RNasen, eines der Hauptprobleme der m-RNA-Präparationen, lassen sich durch Heißluftautoklavieren bei 250°C vollständig inaktivieren. Alle Glaswaren, Pipetten, Spatel und sonstigen ausreichend temperaturstabilen Geräte wurden vor ihrer Verwendung für 6 h auf 250°C erhitzt.

Alle übrigen Hilfsmittel, wie Plastikpipettenspitzen und Magnetrührkerne, wurden zweimal für 25 min bei 121°C im Heißdampf autoklaviert.

Zum Arbeiten mit diesen Geräten sind Handschuhe obligatorisch, um eine Rekontamination zu vermeiden.

10.2 Herstellung von Lösungen für RNA-Präparationen

Zur Herstellung von Lösungen wurde ausschließlich zweifach autoklaviertes destilliertes Wasser verwendet, um die Gefahr einer RNase-Kontamination so klein wie möglich zu halten.

Alle Lösungen wurden ebenfalls, soweit als möglich, zweifach autoklaviert.

10.3 Zellaufschluß

Zum Zellaufschluß wurden Potter-Homogenisatoren (1) verwendet, weil sie, da vollständig aus Glas gefertigt, durch Hitzebehandlung RNase-frei gemacht werden können.

(1) BRAUN MELSUNGEN

Zellsuspensionen wurden abgenutscht, mit 1%-iger Saccharose-lösung gewaschen und zum Aufbrechen der Zellen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im Eisbad läßt man den Stickstoff vollständig abdampfen, überführt dann etwa 10 g des Materials in einen Potter-Homogenisator und setzt 30 ml Aufschlußpuffer nach MANIATIS et.al. (1982) zu.

10.4 Reinigung der Gesamt-RNA und Anreicherung von poly-A⁺-mRNA

Die Gewinnung der Gesamt-RNA und Anreicherung der poly-A⁺-mRNA wurde nach der von MANIATIS et.al. (1982) dargestellten Methode durchgeführt. Allerdings ist den bei MANIATIS et.al. auf S.196 beschriebenen Arbeitsschritten nach Schritt 1 ein weiterer hinzuzufügen.

Schritt 1a)

Zum Abtrennen nicht aufgeschlossener Zellen und zur Entfernung von Zellwandbruchstücken ist die erhaltene viskose Suspension für 15 min bei 4°C und 12000 g zu zentrifugieren (1).

Nur der klare Überstand wird für die RNA-Isolierung eingesetzt.

10.5 Konzentrationsbestimmung von RNA

Zur Konzentrationsbestimmung dienen UV-Spektren der RNA-lösungen. In manchen Schritten, z.B. beim Eluat der oligo-dT-Cellulosesäule, muß die gesamte Probe zur zuverlässigen Konzentrationsbestimmung eingesetzt werden; es ist ein besonderes Augenmerk auf RNase-freie Quarzküvetten zu legen.

Man erreicht dies durch mindestens 6-stündige Lagerung der Quarzküvetten in konzentrierter Salpetersäure (2). Vor dem Gebrauch werden die Küvetten mit absolutem Ethanol ausgespült und an der Luft getrocknet.

(1) z.B. Sorvall SS34, 13000 Upm

(2) Quarzküvetten sind geklebt. Sie können deshalb nicht mit Heißluft autoklaviert werden.

11. DNA - präparative Methoden

11.1 Aufschluß von Zellmaterial

Zum mechanischen Zerkleinern tiefgefrorenen Zellmaterials diente ein Edelstahlmixer (1). Der Gewebebehälter muß so konstruiert sein, daß die Antriebsdichtungen auch unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff betrieben werden können.

11.2 DNA - Fällung

Zur Konzentrierung von DNA oder zum Abtrennen von Begleitkomponenten verwendet man verschiedene Fällungsmethoden.

Die DNA-Konzentrierung kleiner Volumina läßt sich unproblematisch durch Ethanolfällung erreichen. Bei chromosomaler DNA ist das Pellet jedoch häufig nur schwer wieder in Lösung zu bringen.

Die Fällung mit Polyethylenglykol ist besonders beim Abtrennen der DNA aus großen Volumen angebracht, da man das Polyethylenglykol direkt in der DNA-haltigen Flüssigkeit auflösen kann, es somit nicht zu einer Vervielfachung des Volumens wie bei der Ethanolfällung kommt. Außerdem ist Polyethylenglykol wesentlich billiger als absoluter Ethanol, was sich bei großen Volumen bemerkbar macht. Andererseits muß Polyethylenglykol aufwendiger von der DNA wieder abgetrennt werden als Ethanol, der im Vakuum einfach abzudestillieren ist.

11.2.1 Ethanol - Präzipitation

- Volumen der Lösung bestimmen
- Fällhilfe d.h. 1/10 Volumen 4 M NaCl, 4 M LiCl oder 3 M NaAcetat zusetzen und mischen
- 2.5 Vol Ethanol abs., gekühlt auf -20°C , zusetzen und gut mischen
- 10 min in ein Ethanol/Trockeneisbad stellen (= -70°C)
- 15 min bei 4°C bei 15000 g abzentrifugieren (2)

(1) z.B. WARING COMMERCIAL BLENDOR

(2) z.B. Eppendorffzentrifuge

- Überstand abnehmen, 1 ml 70%-igen EtOH zum Waschen des Pellets zusetzen und 5 min abzentrifugieren
- Pellet im Vakuum trocknen

11.2.2 PEG 6000 - Fällung

- Volumen der Lösung bestimmen
- 1/9 Vol 5 M NaCl zusetzen
- 10 % (G/V) PEG 6000 zusetzen (1) und unter Rühren auflösen
- für 4 - 12 h auf 4°C kühlen
- Suspension in sterile Zentrifugenbecher überführen und bei 10000 g das DNA-Präzipitat 10 min sedimentieren.
- Pellet in TE-Puffer aufnehmen
- 2 x mit je 1 Volumen CHCl_3 /Isoamylalkohol extrahieren (3).
Um die Interphase in stabiler Form vom Überstand leicht trennen zu können, für 10 min bei 10000 g zentrifugieren (2). Zur Steigerung der Ausbeute kann die Interphase der ersten Extraktion mit etwa 20% des Volumens an TE-Puffer reextrahiert und mit dem ersten Überstand vereinigt werden.
- 2 x mit Phenol/ CHCl_3 extrahieren
- 1 x mit CHCl_3 /Isoamylalkohol extrahieren
- Zur Entfernung von CHCl_3 - oder Isoamylalkohol-Resten für einige Minuten Vakuum anlegen.

11.3 Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation dient zur Differenzierung von Probenmaterial nach dessen Schwimmdichte.

Die dafür benötigten Ultrazentrifugen waren von verschiedenen Herstellern (SORVALL, KONTRON, BECKMANN). Im Rahmen der hier beschriebenen Anwendungen gibt es keine Präferenzen für einen bestimmten Typ. Deshalb sind bei den einzelnen Experimenten die Antriebsmaschinen auch nicht weiter erwähnt.

-
- (1) Es ist das Gesamtvolumen aus der Summe der Volumen der Probenlösung und der Kochsalzlösung zu nehmen
 - (2) z.B. Sorvall SS34, 9000 Upm
 - (3) Dieser Schritt dient ausschließlich dazu, mitausgefallenes Polyethylenglykol zu zerstören; wird hier ein Phenolzusatz verwendet, löst sich die DNA in der organischen Phase und ist verloren.

11.3.1 Saccharosegradienten

Saccharosegradienten lassen sich sehr einfach durch einen Einfrier-/Auftauzyklus, auch auf Vorrat, herstellen.

Wird z.B. ein Gradient für den Bereich 10% - 40% Saccharose gewünscht, reicht es, eine Lösung mit 25% Saccharose, also der mittleren Konzentration, anzusetzen und in die Zentrifugenröhrchen zu füllen.

Diese werden senkrechtstehend bei -70°C eingefroren, anschließend bei Raumtemperatur aufgetaut und erneut eingefroren. In dieser Form können sie bis zur Verwendung aufbewahrt werden.

Kurz vor ihrem Einsatz entnimmt man soviele vorbereitete Röhrchen wie benötigt werden und läßt sie bei Raumtemperatur vollständig auftauen. Die Proben können direkt auf die vorgeformten Gradienten gegeben, austariert und gefahren werden.

11.3.2 Cäsiumchloridgradienten

Cäsiumchloridgradienten wurden insbesondere zur Abtrennung von RNA von DNA verwendet. Das Einstellen der Cäsiumchloridkonzentration erfolgte über den Brechungsindex, der mit einem Abbe-Refraktometer gemessen wurde.

Die verwendeten Rotoren sowie alle weiteren Parameter werden bei den einzelnen Experimenten angegeben.

11.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Bei der Extraktion von DNA aus Gelen sind gute Ausbeuten und schonende Behandlung der DNA von größtem Interesse. Je nach Größe der DNA oder nach der Art des nachfolgenden Arbeitsschrittes müssen verschiedene Methoden verwendet werden.

11.4.1 Verwendung von LMP-Agarose

Die Extraktion von DNA aus Agarose und LMP-Agarose beruht auf einer Zerstörung der Struktur der Agarose durch die Phenolbehandlung und das Schockgefrieren. In dieser Kombination werden auch für größere DNA-Fragmente gute Ausbeuten erzielt.

Arbeitsanleitung

- 1) DNA-Fragmente aus dem Agarosegel ausschneiden
- 2) Gelstück in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß überführen und auf 68°C erwärmen.
- 3) Das gleiche Volumen Tris-gepuffertes Phenol zusetzen und für einige Sekunden gut durchschütteln
- 4) 15 min in ein Ethanol/Trockeneis - Bad stellen
- 5) 15 min bei Raumtemperatur bei 15000 g (1) zentrifugieren
- 6) Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen
2 x mit Phenol/Chloroform extrahieren
- 7) 2 x mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahieren
- 8) 1/10 Vol 4 M LiCl und 2 Vol Ethanol abs. -20°C zusetzen
- 9) 10 min Ethanol/Trockeneis - Bad
- 10) 15 min abzentrifugieren und mit 1 ml 70 % EtOH waschen
- 11) im Vakuum trocknen (2)

11.4.2 Bindung an DEAE-Cellulose

Für viele Fälle einfacher und zudem visuell kontrollierbar ist die DNA - Extraktion mit DEAE-Membranen (3). Sie ist besonders für Fragmente bis zu einigen Kilobasen geeignet. Bei höhermolekularer DNA sind Verluste zu befürchten. Unter den Bedingungen der Puffersysteme für Agarosegelelektrophorese bindet DNA an DEAE-Material und kann mit hohen Salzkonzentrationen wieder eluiert werden. Der hohe Salzanteil im Eluat ist geeignet, die DNA nach Zusatz von 3 Volumen Wasser direkt zu fällen.

Arbeitsanleitung

Hochsalz - NET - Puffer

- 1 M NaCl
- 0.1 mM EDTA
- 20 mM Tris/HCl pH 8.0

(1) EPPENDORF, Hamburg; Zentrifuge 5414
(2) SAVANT, Speed Vac Concentrator
(3) SCHLEICHER & SCHÜLL, NA-45 DEAE-Membran

A) Vorbereiten von DEAE - Membranen

10 min 10 mM EDTA pH 7.5

5 min 0.5 M NaOH

3 x 5 min in Aqua bidest. spülen

bei 4°C in Aqua bidest. lagern

B) Extraktion der DNA

- Vor und hinter dem gewünschten Bereich eine Tasche in das Agarosegel schneiden. Jeweils einen schmalen Streifen präparierte DEAE-Membran sorgfältig hineinstecken, so daß er ohne Falten über die ganze Front verläuft und das Gel bis zur Glasplatte durchdringt.
- Elektrophorese weiterlaufen lassen und unter UV beobachten, ob alle DNA bereits an die Membran gebunden ist.
- Elektrophorese stoppen, Membranstreifen herausnehmen und unter UV kontrollieren.

C) Elution der DNA

- Von dem Streifen alle Teile abschneiden, auf denen keine DNA zu erkennen ist
- Membrane in ein Eppendorfgefäß stecken und mit 150 µl Hochsalz - NET - Puffer bedecken
- 20 min bei 68 °C inkubieren
- abzentrifugieren und Puffer in ein neues Gefäß überführen
- noch 2 x mit je 50 µl Hochsalz-NET - Puffer für je 10 min bei 68°C die DEAE-Membran eluieren
- Erfolg unter UV überprüfen
- die vereinigten Eluate (250 µl) mit 750 µl wassergesättigtem n-Butanol extrahieren
- 750 µl EtOH abs. -20°C zusetzen und zum Fällen für 15 min in ein Ethanol/Trockeneisbad stellen
- 15 min bei 4°C abzentrifugieren
- Pellet in 250 µl 0.3 M NaAcetat aufnehmen
- mit 750 µl EtOH fällen und mit 1 ml 70 % EtOH waschen
- DNA trocknen

12. Analytische Methoden für DNA und RNA

12.1 Restriktionen

Restriktionen wurden mit kommerziell erhältlichen Enzymen der Firmen Boehringer Mannheim, BRL, Pharmacia und New England Biolabs durchgeführt. Als Puffer für die Restriktionsansätze wurden die in den Beipackzetteln angegebenen Mischungen verwendet.

12.2 Gelelektrophoretische Methoden

Zur Auftrennung von RNA- und DNA-Molekülen nach ihrer Größe eignet sich Agarosegelelektrophorese.

12.2.1 Glyoxalgelelektrophorese

Zur längenabhängigen Auftrennung von RNA muß diese denaturiert werden. Dies läßt sich u.a. durch Derivatisierung mit Dimethylsulfoxid (=DMSO) erreichen.

Arbeitsanleitung für die Glyoxalgelelektrophorese

Denaturierung der RNA

- 4 µl 6 M Glyoxal
- 12 µl DMSO
- 2.4 µl 100 mM NaH_2PO_4 pH 6.6
- 5.6 µl RNA (maximal 30 µg)
- 1 h / 50°C

Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der RNA verwendet man ein 1%-iges Agarosegel von 20 x 20 cm in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.6 (1).

Auftragspuffer : 50 % Glycerin
 10 mM NaH_2PO_4 pH 6.6
 0.5 % Bromphenolblau

Pro Probenansatz 6 µl Auftragspuffer dazupipettieren und für 4 h bei 120 V Spannung auftrennen.

(1) Kein Ethidiumbromid zusetzen. Reagiert mit Glyoxal.

Falls das Gel auch optisch detektiert werden soll, trennt man die betreffende Spur nach der Elektrophorese ab und verfährt wie folgt:

1	h	100 ml	50 mM NaOH
3 x	10 min je	50 ml	200 mM Natriumacetat pH 4.0
	15 min	30 ml	0.01 % Ethidiumbromidlösung

Die RNA kann im UV-Durchlicht fotografiert werden.

12.2.2 Agarosegelelektrophorese

Agarosegele wurden entweder als Minigele (5x9 cm, Vol. 10 ml) oder als Flachbettgele (20x20 cm, Vol. 100 ml) benutzt.

Zusammenstellung der Ausrüstung:

Spannungsquelle	:	0 - 200 V, 0 - 500 mA (1)
Elektrophoresekammern	:	Minigelapparaturen (1) Makroflachbettkammer (2)
Elektrophoresepuffer	:	1 x TBE pH 8.0 (3)
Agarosetypen	:	Agarose : BRL LMP-Agarose (Typ VII) : Sigma
Agarosekonzentrationen:	:	0.5 - 1.2 % (meist 0.8 %)
Ethidiumbromid	:	1 µg/ml Gellösung
Feldstärken	:	1 - 6 V/cm
Kühlung	:	LMP-Gele wurden unter Wasser- kühlung bei 10°C betrieben.

Die Proben wurden vor der Elektrophorese für 5 min. bei 68°C aufgeschmolzen und mit dem halben Volumen Agarosebeads (4) gemischt.

12.3 Nukleinsäuretransfermethoden

Für Hybridisierungsreaktionen sind Gele nicht geeignet. Ein gebräuchliches Verfahren ist es, die DNA bzw. RNA auf Nitrocellulosepapier zu übertragen, an die sich beide binden.

(1) Werkstätten der Universität München

(2) CAMAG

(3) siehe Seite 53

(4) Agarosebeads : 0,2 % Agarose
14 % Glycerin
10 mM Tris/HCl pH 7.5
1 mM EDTA

12.3.1 Northern-Blot

Glyoxalierte RNA kann ohne weitere Vorbehandlung aus einem Agarosegel auf Nitrocellulose transferiert werden.

Als Blotpuffer diene 20x SSPE (2).

Die Transferierung der RNA wurde nach dem konventionellen Kapillarverfahren durchgeführt. Eine Skizze der Anordnung sowie die dazugehörige Arbeitsanleitung findet sich bei MANIATIS et.al. (1982).

Vor der Hybridisierungsreaktion muß die Glyoxal-Guanin-Verbindung zerstört werden. Dazu kocht man das Nitrocellulosefilter in 200 ml 20 mM Tris/HCl pH 8.0 für 10 min.

12.3.2 Southern-Schnellblot

Zur Transferierung von DNA aus Agarosegelen auf Nitrocellulose wurde eine Schnellblotmethode verwendet. Die einzelnen Arbeitsschritte sind:

Vorbereitung des Agarosegels:

- 1) Zuschneiden des Agarosegels
Alle nicht benötigten Gelbereiche sind zu entfernen, damit mit niedrigen Volumen Hybridisierungslösung gearbeitet werden kann (1).
- 2) Gel mit deionisiertem Wasser spülen
- 3) 2 x 20 min mit 0.25 M HCl
- 4) 2 x 20 min mit 1.5 M NaCl/ 0.5 M NaOH
- 5) 2 x 20 min mit 3 M NaCl/ 0.5 M Tris/HCl pH 7.0
- 6) 1 x 5 min mit 20 x SSPE (2)

-
- (1) Es empfiehlt sich dringend, das fertig zugeschnittene Gelstück zusammen mit einem Längenmaßstab zu fotografieren, um später die Auswertung zu erleichtern. Gelstücke mit weniger als 2 cm Breite bzw. Länge lassen sich nicht verarbeiten, da sie durch die entstehenden Belastungen zu stark deformiert werden.
 - (2) 20x SSPE :

174	g	Natriumchlorid
6.4	g	Natriumhydroxid
27.6	g	Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat
7.4	g	EDTA
ad 1000 ml Aqua dest.		

eingestellt auf pH 7.4, sterilfiltriert 0.2 µm

Die Säurebehandlung der DNA dient zur partiellen Hydrolyse der zu transferierenden DNA; so können auch hochmolekulare DNA-Banden mit guter Ausbeute aus der Agarose ausdiffundieren. Durch die Natronlaugebehandlung werden die Doppelstränge getrennt, was für die Hybridisierungen notwendig ist.

Die Lösungen werden zur Verminderung der Diffusion auf 0°C gekühlt.

Vorbereiten der Blottingapparatur:

- 1) NC-Filter paßgenau zuschneiden und in Aqua bidest. benetzen. Danach in 20 x SSPE inkubieren.
- 2) Blotapparatur zusammensetzen:
(dazu dient ein normaler Vakuumgeltrockner)
Man legt in folgender Reihenfolge auf die Gitterplatte des Geltrockners:
 - 2 Lagen Filterpapier (1), so groß wie das Gitter
 - vorbereitetes Nitrocellulosefilter
 - wie oben vorbehandeltes Agarosegel
 - 8 Lagen auf die Größe des Agarosegels zugeschnittenes Filter-Papier, getränkt mit 20 x SSPE
 - Mit Plastikfolie (2) alle Bereiche der Trägerplatte außerhalb des NC-Filters exakt abdecken.
 - Gummiabdichtung des Geltrockners

Schnellblot:

- 1) 10 min Vakuum (3)
- 2) Vorsichtig die oberen 7 Lagen Filterpapier abnehmen und erneut in 20 x SSPE tränken.
- 3) 10 min Vakuum
- 4) NC-Filter entnehmen und sorgfältig von eventuellen Gelresten befreien. Die Orientierung markieren (4).
- 5) NC-Filter zwischen 2 Filterpapieren sorgfältig abtrocknen
- 6) NC-Filter zwischen 2 frischen Filterpapieren bei 80°C für 2 Std. backen (5).

-
- (1) z.B. WHATMAN 3MM- Papier
 - (2) z.B. PARAFILM
 - (3) Wasserstrahlpumpenvakuum ist ausreichend.
 - (4) Das Abtrennen einer Ecke wie bei einer Lochkarte ermöglicht eine zweifelsfrei Orientierung des Filters.
 - (5) Die Filterpapiere sind zu beschweren, damit sich die Nitrocellulose beim Trocknen nicht wirft.

12.4 Bestimmung des G/C - Gehaltes

Der G/C - Gehalt der DNA ist ein für den betreffenden Organismus charakteristischer Wert.

Für die praktische Arbeit ist die Korrelation des G/C - Gehalts der DNA mit ihrer Schwimmdichte (DE LEY (1970)) von Bedeutung. Das Erstellen optimaler Bedingungen für die kostspielige Cäsiumchloridgeleichgewichtszentrifugation läßt sich drastisch beschleunigen.

Zur Ermittlung des G/C - Gehaltes mißt man die Veränderung der Absorbtion bei kontinuierlichem Anstieg der Proben temperatur. Einzelsträngige DNA, wie sie nach dem Aufschmelzen chromosomaler DNA entsteht, hat einen höheren Absorbtionskoeffizienten als doppelsträngige. Bei welcher Temperatur sich die Stränge trennen, ist abhängig vom G/C-Gehalt der DNA.

Die relative Absorbtionsänderung, die beim Aufschmelzen beobachtet wird, stellt zudem ein sensitives Reinheitskriterium für die DNA-Präparation dar.

Zur G/C - Gehaltsbestimmung wurde ein Photometer mit kontrolliert temperierbarer Küvette verwendet. Die Absorbtion in Abhängigkeit zur Temperatur wurde auf einem Plotter dargestellt.

Die Anlage bestand aus folgenden Komponenten:

GILFORD 2600 Spektralphotometer (1)

GILFORD Thermo Programmer 2527 (1)

mit 4-Wege Thermoküvette

(je 500 µl Zellenvolumen)

HEWLETT PACKARD 7225A - Plotter (2)

(1) GILFORD Instruments, Düsseldorf

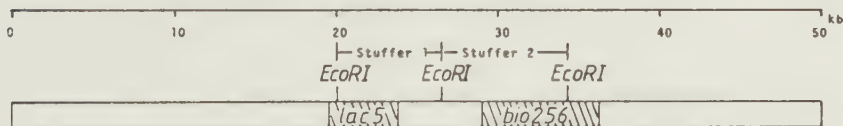
(2) HEWLETT-PACKARD GmbH, Taufkirchen b. München

13. Klonierungsvektoren

13.1 Lambda-Phagen

Lambda-Phagen werden häufig zur genomischen Klonierung verwendet. Unter den vielen bis heute konstruierten Lambda-Phagen (vgl. BLATTNER et.al. (1977), WILLIAMS u. BLATTNER (1979)) sind einige Vertreter, mit denen es möglich ist, bis zu 20 kb zu klonieren. Die Klonierungskapazität ist insbesondere für die Anlage von Genbanken eukaryotischer Organismen mit großen Genomen ein wesentliches Kriterium.

Die Wahl fiel auf den Phagen Charon 4A. Bei diesem Phagen geht der Klonierungsbereich von 8 - 22 kb. Wird Fremd-DNA geringerer Länge einligiert, so läßt die Effizienz der Verpackung drastisch nach. Dies vermeidet, daß man rekombinante Phagen mit nur kleinen Inserts erhält, die bei der lac 5 - abhängigen Selektion von Rekombinanten mit Inserts der gewünschten Größe nicht zu unterscheiden sind.



Restriktionsschnittstellen Eco RI: 19940, 26570, 34320 bp

CHARON 4A

Gesamtlänge: 45.4 kb

Klonierungsbereich: 8 - 22 kb

Genetische Charakterisierung:

Aam32 BamI lac5 bio256 ∇ KH54 ∇ N1N5 $\emptyset$ 80QSR

Abb. 12 Phage Charon 4A mit den wichtigsten Strukturen

13.1.1 Herkunft

Der verwendete Phage Charon 4A ist kommerziell erhältlich in Form von Phagen-DNA (1).

Zur Gewinnung von infektiösen Phagenpartikeln setzt man diese DNA in eine in-vitro-Verpackungsreaktion ein. Verpackungs-extrakte sind von verschiedenen Herstellern (2) erhältlich.

13.1.2 Anzucht und Isolierung von Phagen-DNA

Zur Vermehrung der Phagen infiziert man E. coli-Zellen und wartet die Lyse der Bakterienzellen ab. Das Bakterienlysat enthält in hoher Menge intakte infektiöse Phagen, die entweder für weitere Vermehrungen oder zur Gewinnung der Phagen-DNA verwendet werden können.

Zur Phagenanzucht wurde der E. coli-Stamm Y1088 verwendet:

Y1088 - supE, supF, metB, trpR, hsdR⁻, hsdM⁺,
 tonA21, strA, lacU169, proC::Tn5, (pMC9)
 (P. Buckel, Tutzing; ATCC Nr. 37195)

Alle Prozeduren zur Vermehrung von Lambda-Phagen und zur Reinigung der Phagen-DNA entstammen dem Buch von SILHAVY et.al. (1984).

Dort finden sich exakt ausgearbeitete Anleitungen für alle Arbeitsschritte; für den hier verwendeten Phagen sind das im speziellen die Prozeduren 1 - 4 (S.89-96) und 26 (S.140-141) sowie Anhang G (S.239-240).

13.1.3 Selektion von rekombinanten Klonen

Zur Selektion rekombinanter Phagen wurden Zellen des beschriebenen Stammes Y 1088 mit ihnen infiziert, auf X-Gal-Platten ausplattiert und bebrütet. Der Stamm selbst hat kein lacZ-Gen. Wird mit einem Phagen ein solches eingeschleust, so inhibiert

(1) AMERSHAM BUCHLER, Braunschweig
(2) u.a. BOEHRINGER MANNHEIM

der auf dem Plasmid pMC9 codierte lac-Repressor die Transkription. IPTG inaktiviert den lac-repressor und die Transkription des Phagen-lacZ-Gens kann stattfinden. Es wird funktionsfähige β -Galaktosidase gebildet, welche X-Gal zu einem blauen Farbstoff umsetzt, falls kein Insert vorliegt. Andernfalls beobachtet man farblose Plaques, was den Nachweis für Rekombinante darstellt.

Medien

LB-Medium

1 % Trypton
0.5 % Hefeextrakt
1 % NaCl
pH 7.5 mit NaOH

Top-Agar

0.7 % Agar-Agar
10 mM Mg^{2+}
in LB-Medium

X-Gal-Platten

1 mM IPTG
0.004 % X-Gal
1.5 % Agar-Agar
in LB-Medium

SM-Puffer

50 mM Tris/HCl pH 7.5
8 mM Mg^{2+}
0.1 M NaCl
0.01 % Gelatine

Arbeitsanleitung

1) Übernachtskultur von Y 1088

Mit einer Kolonie 10 ml LB-Medium, das 100 μ g/ml Ampicillin und 0.2 % Maltose enthält, animpfen und über Nacht bei 37°C schütteln.

2) Infektion

Top-Agar aufschmelzen, portionieren zu 3 ml und im Wasserbad auf 47°C temperieren.

200 μ l ÜK mit 100 μ l Phagenverdünnung versetzen und 20 min bei 37°C inkubieren. Die Phagen müssen mit SM-Puffer so verdünnt werden, daß etwa 200-300 Plaques pro Petrischale, d.h. pro Infektionsansatz zu erwarten sind.

3) Plattieren und Bebrüten

Zu jedem Infektionsansatz eine Portion Top-Agar zumischen und auf die X-Gal-Platten ausplattieren. Nach Erkalten des Top-Agars für 8 - 40 h bei 37°C bebrüten. Rekombinante bilden farblose Plaques, unveränderte Phagen blaue.

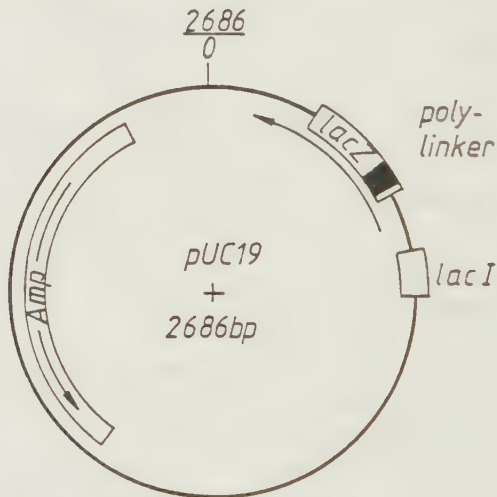
13.1.4 Lagerung von Phagenpartikeln

Phagenlysate können nach Zusatz von 0.1 % Chloroform bei 4°C im Kühlschrank über Jahre hinweg gelagert werden.

13.2 pUC-Plasmide

13.2.1 Struktur und Herkunft

pUC19 ist ein E. coli-Plasmidvektor, der auf Grund seines Poly-linkers vielfache Klonierungsmöglichkeiten eröffnet und mit dem Lac Z - Gen eine sensitive visuelle Detektionsmöglichkeit anbietet (YANISCH-PERRON et.al. (1984)).



Schnittstellen im Polylinker:

EcoRI SacI KpnI XmaI SmaI BamHI XbaI HincII
SalI AccI PstI SphI HindIII

Abb. 13 pUC19 - Plasmid mit den wichtigsten Strukturen

Für die Überlassung von pUC19-Plasmid-DNA danke ich Herrn F. Binder, Institut für Genetik und Mikrobiologie, München. Dieses Plasmid ist auch kommerziell erhältlich (1).

(1) z.B. BOEHRINGER MANNHEIM oder NEW ENGLAND BIOLABS

13.2.2 Bakterienmaterial und Nährmedien

Als Wirt wurde der E. coli-Stamm JM 105 verwendet:

JM 105 - thi, rpsL, endA, sbcB15, hsdR4, Δ (lac-proAB) /
F'traD36, proAB⁺, lacI^q Δ M15

Untransformierte Bakterienzellen wurden in Werkmann-Minimalmedium angezogen; zur Vermehrung transformierter Zellen diente LB-Medium:

Werkmann-Minimalmedium

50 mM Na₂HPO₄
100 mM KH₂PO₄
0.1 mM CaCl₂
1 mM MgSO₄
15 mM (NH₄)₂SO₄

LB-Medium

1 % Trypton
0.5 % Hefeextrakt
1 % Natriumchlorid

Alle Medien wurden durch Autoklavieren sterilisiert.

Werkmann-Minimalmedium wurde vor der Verwendung mit getrennt autoklavierten bzw. sterilfiltrierten Stocklösungen auf folgende Endkonzentrationen eingestellt:

1.0 % Glukose
5 µg/ml Thiamindichlorid

Zur Detektion rekombinanter Klone wurden IXA - Platten verwendet. IPTG induziert die Transkription des Plasmid-LacZ-Gens. Bei Rekombinanten ist dieses Gen durch Insertion zerstört, sie erscheinen auf den Agar-Platten farblos; bei Ausbildung intakter β -Galaktosidase entsteht aus X-Gal ein intensiv blauer Farbstoff.

IXA - Platten : LB - Medium mit

1.5 % Agar-Agar
1 mM IPTG
0.004 % X-Gal
200 µg/ml Ampicillin

IPTG, X-Gal und Ampicillin wurden erst nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 60°C zugesetzt. IPTG und Ampicillin kamen als sterilfiltrierte Stocklösungen zum Einsatz; X-Gal wurde unter sterilen Bedingungen in Dimethylformamid gelöst und zugegeben.

13.2.3 Schnellpräparation

Zur Schnellanalyse, insbesondere von Einzelkolonien, diente die Methode zur Plasmidisolation nach BIRNBOIM (1979). Sie zeichnet sich dadurch aus, daß schon nach 2 h Plasmid-DNA vorliegt, die für Restriktions- und Hybridisierungsexperimente ausreichende Reinheit aufweist.

Arbeitsanleitung für die Plasmidschnellpräparation

Lösung A

50 mM Glukose
10 mM EDTA
25 mM Tris/HCl pH 8.0
4 mg/ml Lysozym
(Lysozym jeweils frisch
zusetzen)

Lösung K

3 M Kaliumacetat
11.5 % Eisessig
28.5 % Aqua bidest.
pH 4.8 - 5.0

Lösung N

200 mM NaOH
1 % SDS
(jeweils frisch mischen)

Arbeitsgang

1) Kulturmedium abtrennen

1.5 ml Übernachtskultur plasmidhaltiger E. coli-Zellen für
3 min in einem 1.5 ml Eppendorfkegel abzentrifugieren

2) Zellwände enzymatisch andauen

Sediment in 100 µl eisgekühlter Lösung A vollständig
resuspendieren und für 5 min bei Raumtemperatur stehen
lassen

3) Lyse der Bakterienzellen

200 µl Lösung N zusetzen, kurz umschütteln und für 5 min
ins Eisbad stellen

4) Fällern hochmolekularer DNA

150 µl Lösung K zusetzen, 10 sec whirln (1) und für
5 min in ein Eisbad stellen

(1) HEIDOLPH, Whirlmixer

- 5) Abtrennen der Zellwände und chromosomalen DNA
10 min bei 4°C abzentrifugieren und Überstand in ein neues Gefäß überführen
- 6) Endproteinieren der Plasmidlösung
450 µl Phenol/Chloroform zusetzen, kurz whirlen und zur Phasentrennung für 2 min zentrifugieren. Obere Phase abnehmen und in neues Eppendorfgefäß überführen.
- 7) Ausfällen der Plasmid-DNA
800 µl Ethanol abs. (Raumtemperatur, nicht gekühlt) zusetzen, mischen und für 2 - 5 min bei Raumtemperatur stehen lassen und anschließend 5 min abzentrifugieren. Überstand verwerfen.
- 8) Waschen des Plasmid-DNA Pellets
1 ml 70%-igen Ethanol zusetzen und für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugieren. Überstand abnehmen und das DNA-Pellet im Vakuum (1) trocknen.
- 9) RNase-Behandlung
Pellet in 47 µl TE-Puffer lösen und 3 µl RNase A (1mg/ml) (2) zusetzen und für 10 min bei 37°C inkubieren. Die RNase muß nicht abgetrennt werden, da sie bei Restriktionen nicht stört.

Die so gewonnene Plasmid-DNA enthält zwar noch geringe Anteile chromosomaler DNA, die aber bei den meisten Experimenten keinen störenden Einfluß hat.

13.2.4 Präparative Isolierung

Für größere Versuchsreihen oder Sequenzanalysen nach MAXAM u. GILBERT (1980) liefert die oben beschriebene Methode nicht ausreichende Mengen an reiner Plasmid-DNA. Deutlich zeitaufwendiger, dafür aber auch von wesentlich höherer Kapazität, ist die von CLEWELL u. HELINSKI (1969) beschriebene Plasmidisolierungsmethode.

(1) SAVANT, Speed Vac Concentrator
(2) DNase-frei durch 10-minütiges Kochen (MANIATIS et.al (1982))

Arbeitsanleitung für die präparative Plasmidisolierung

- 1) Übernachtskultur des Plasmidklons
10 ml LB-Medium mit 200 µg/ml Ampicillin(1) wird mit einer Einzelkolonie angeimpft.
- 2) Anzucht der Übernachtskultur bis zur logarithmischen Phase
Einen 2 l Erlenmeyerkolben, der 500 ml LB-Medium mit 200 µg/ml Ampicillin enthält, mit 5 ml Übernachtskultur animpfen und bei 37°C mit 200 Upm schütteln und die O.D._{420nm} verfolgen, bis ein Wert von 0.5 - 0.7 erreicht wird.
- 3) Plasmidamplifikation (Inhibieren der Proteinbiosynthese)
Chloramphenicol auf eine Endkonzentration von 150 µg/ml zusetzen und für mindestens 4-5 h bei 37°C weiterschütteln
- 4) Ernte der Bakterienzellen
Abzentrifugieren der Bakteriensuspension bei 7000 g (z.B. 10 min 7000 Upm bei 4°C in Sorvall GS3 - Rotor)
- 5) Waschen des Bakterienpellets
Pellet in 20 ml gekühltem TE-Puffer aufnehmen. Abzentrifugieren bei 12000 g (z.B. 10 min bei 10000 Upm in Sorvall SS34 - Rotor)
- 6) Andauen der Bakterienzellwände, Inhibieren von DNasen
Pellet in 4 ml eiskaltem 50 mM Tris/HCl pH 8.0, der 2.5% Saccharose enthält, resuspendieren und in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit einem Magnetrührfisch vorsichtig homogenisieren. 0.5 ml Lysozymlösung (10 mg/ml) zusetzen und für 5 min im Eisbad rühren. Danach 0.5 ml 0.5 M EDTA pH 8.5 zusetzen und für weitere 10 min im Eisbad rühren.
- 7) Lyse der Bakterienzellen
5 ml frisch angemachte Detergenzlösung zusetzen und für 15 min im Eisbad rühren
Detergenzlösung: 0.1 % Triton X 100
62.5 mM EDTA pH 8.5
50 mM Tris/HCl pH 8.0

(1) Das Antibiotikum richtet sich nach der auf dem Plasmid codierten Resistenz. Die Dosierung ist korreliert mit der Kopienzahl des Plasmids und muß bei Verwendung anderer Plasmide eventuell verändert werden.

8) Grobabbtrennung der chromosomalen DNA

Der erhaltene pastöse Schleim wird durch Ultrazentrifugation von den unlöslichen und ausgefallenen Bestandteilen getrennt, z.B. 45 min bei 35000 Upm in 70Ti-Rotor bei 4°C.

Den Überstand nimmt man mit einer Pipette mit weiter Bohrung langsam ab und überführt ihn in einen 25 ml Erlenmeyerkolben.

9) Abtrennen von Protein und RNA, Grobtrennung von Plasmid und chromosomaler DNA

0.95 g Cäsiumchlorid pro ml DNA-Lösung zusetzen und bei Raumtemperatur rühren, bis es sich vollständig gelöst hat. Zusetzen von Ethidiumbromid bis zu einer Konzentration von 250 µg/ml. Den Brechungsindex überprüfen und gegebenenfalls nachstellen. Für den verwendeten Bakterienstamm und pUC19-Plasmid mit insertierter Pflanzen-DNS war ein Brechungsindex von 1.390 - 1.396 einzustellen. Die Ultrazentrifugation in Quicksealtubes durchführen.

(30 h bei 40000 Upm in 70 Ti bei 15°C)

10) Abziehen der DNA-Bande, Auftrennung nach chromosomaler und Plasmid-DNA

Neben dem RNA-Pellet am Röhrchenboden und dem Proteinanteil am oberen Ende des Gradienten ist eine mehr oder weniger stark strukturierte DNA-Bande im UV-Licht zu sehen. Idealerweise zeigen sich zwei getrennte Banden, wobei die obere dünnere die chromosomale DNA, die untere Plasmid-DNA (auf Grund der zirkulären Struktur hat sie eine höhere Dichte) darstellt. Die untere Bande wird mit einer Spritze abgezogen. Verunreinigungen mit der oberen Bande sind nur bei sehr niedriger Beladung des Gradienten zu vermeiden.

Der Brechungsindex der abgezogenen DNA-Lösung wird gemessen.

Die DNA wird in einen Vertikalrotorbecher überführt und mit Cäsiumchlorid/Ethidiumbromidlösung des gleichen Brechungsindex aufgefüllt.

Ultrazentrifugation, z.B. 24 h bei 40000 Upm in TV865 bei 15°C

11) Gewinnung der Plasmid-DNA

Die untere DNA-Bande wird mit einer sterilen Spritze abgezogen und 3-mal mit dem gleichen Volumen Cäsiumchlorid-gesättigtem Isopentanol extrahiert. Das Ethidiumbromid tritt in die organische Phase über (intensiv lila).

Zur Entfernung des Cäsiumchlorids dialysiert man für mindestens 6 h gegen 2 l TE-Puffer.

13) Reinheitskontrolle und Konzentrationsbestimmung

Die erhaltene Plasmidpräparation ist auf Anteile chromosomaler DNA und ihre Schneidbarkeit durch Restriktionsenzyme zu überprüfen. Zur Konzentrationsbestimmung dient die O.D._{260nm}.

13.2.5 Transformation mit Plasmiden

Zur Transformation von JM105 - Zellen mit pUC-Plasmiden wurde die Calciumchlorid-Methode verwendet (COHEN et.al. (1972)).

Arbeitsanleitung zur Transformation von E. coli-Zellen

Zellpräparation

1) Übernachtskultur der Bakterienzellen

10 ml WMM-Medium mit 1.0 % Glukose und 5 µg/ml Thiamin in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit einer Kolonie JM105 animpfen und über Nacht, gut belüftet, bei 37°C schütteln.

2) Log-Kultur von JM105

0.3 ml ÜK zum Animpfen von 30 ml LB-Medium in einem 250 ml EMK verwenden. Die optische Dichte verfolgen, bis O.D._{420nm} = 0.7 erreicht ist.

3) Ernten der Bakterienzellen

Abzentrifugieren: 10 min bei 3000 g (z.B. Sorvall SS34, 5000 Upm)

4) Calciumbehandlung

Pellet resuspendieren in 15 ml eiskaltem 50 mM CaCl_2
15 min im Eisbad stehenlassen

Abzentrifugieren bei 3000 g

Resuspendieren in eiskaltem 50 mM CaCl_2 , nach der Formel

$$\text{Vol } \text{CaCl}_2 = (\text{O.D.}_{420\text{nm}} \times \text{Vol der Logkultur}) / 10$$

5) Lagerung

Bis zur Verwendung auf Eis stellen. Die Zellen können bis zu 24 h später eingesetzt werden.

Transformation

1) Zugabe des zu transformierenden Plasmids

Bis zu 0.5 μg kovalent geschlossenes Plasmid mit 0.2 ml kompetenter Zellen in einem gut wärmeleitenden Gefäß (z.B. dünnwandiges Glas) mischen und für 25 min in Eis stellen

2) Hitzeschockbehandlung

2 - 5 min bei 37°C inkubieren und anschließend 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen

3) Phänotypische Expression

Zu jedem Transformationsansatz 1 ml LB-Medium pipettieren und in 25 ml EMK für 30 - 60 min bei 37°C im Wasserbad schütteln.

Den Ansatz auf IXA - Platten ausplattieren.

4) Bebrüten bei 37°C

Für 12 - 48 h bei 37°C bebrüten

13.2.6 Lagerung von Rekombinanten

Zur Lagerung von Bakterienmaterial mit rekombinanten Plasmiden eignen sich Glycerinkulturen, die bei -30°C gelagert werden.

Für deren Anlage geht man wie folgt vor:

- Von einer ganzen Petrischale den Bakterienrasen mit der Impföse abnehmen und in 1 ml LB-Medium resuspendieren
- 0.7 ml dieser Suspension zu 0.9 ml sterilem Glycerin geben und gut vermischen

14. Hybridisierungen

14.1 Radioaktive Markierung von DNA

14.1.1 Nick-translation doppelsträngiger DNA

Um isolierte DNA-Fragmente, die für Hybridisierungen eingesetzt werden sollten, radioaktiv zu markieren, wurde das Verfahren der Nick-translation eingesetzt.

Dabei wird ausgenutzt, daß DNA-Polymerase Strangbrüche durch Ausbau einiger Nukleotide und Auffüllen der entstandenen Lücke reparieren kann. Setzt man markierte Nukleotide für die Auffüllreaktion ein, erhält man intakte, radioaktiv markierte, doppelsträngige DNA.

Lösungen: 10x Nickbuffer : 0.5 M Tris/HCl pH 7.25
0.1 M MgSO₄
1 mM DTT
500 µg/ml BSA
sterilfiltriert (0.2 µm)

dNTP - Mix : 0.67 mM dGTP
0.67 mM dCTP
0.67 mM dTTP

TES - Puffer : 10 mM Tris/HCl pH 8.0
1 mM EDTA
10 mM NaCl

Reaktionsansatz für die Nick-translation:

5 µl 10 x Nickbuffer
1.5 µl dNTP - Mix
5 µl α-³²P-dATP (111 GBq/µmol und 3.3 µmol/µl) (1)
1.5 µl DNA-Polymerase I (Kornberg-Polymerase) (2)
1 µg DNA
ad 50 µl Aqua bidest.

Mischen, abzentrifugieren und bei 16°C für 1 Std. inkubieren.

(1) NEN, Best.-Nr. NEG-012H

(2) BOEHRINGER, Best.-Nr. 104 485

Dieses Produkt enthält einen definierten Zusatz DNase I.
Das schwer dosierbare Zumischen von DNase entfällt.

Abstoppen der Reaktion:

5 µl 0.5 M EDTA pH 8.0 zusetzen

Abtrennen nicht eingebauter Radioaktivität:

Zur Bestimmung der Einbaurate und zur Verminderung der Hintergrundschwärzung bei der Hybridisierung wird nicht eingebaute Radioaktivität durch Gelfiltration abgetrennt.

Eine silikonisierte Pasteurpipette, 10 cm hoch mit in TES-Puffer gequollenem und autoklaviertem Sephadex G-50 (1) gefüllt und äquilibriert mit 3 ml TES-Puffer, ist ausreichend für die Chromatographie.

Der Auftrag des Nick-translationsansatzes erfolgt vorsichtig mit einer Mikroliterpipette (2). Zur Elution verwendet man TES-Puffer und fraktioniert in 1.5 ml Eppendorfgefäße. Mit Hilfe eines Geigerzählers mit kleinem Zählrohr bzw. einer schmalen Blende mißt man das Säuleneluat an der Spitze der Pasteurpipette ständig und kann somit gezielt fraktionieren.

Man erhält zwei Peaks. Der erste ist die gewünschte radioaktiv markierte DNA (läuft im Ausschlußvolumen), im zweiten erscheint nicht eingebautes ^{32}P -dATP.

Zur Bestimmung der Radioaktivitätsmenge zählt man 1 µl der aktiven Fraktion des ersten Peaks im Tritiumkanal eines Betastrahlungszählers (Cerenkov - Messung).

Den Umrechnungsfaktor für die Berücksichtigung der Zählrate erhält man durch Eichung, z.B. mit einer Verdünnungsreihe markierten ATP's bekannter Aktivität.

Hybridisierung:

Für homologe Hybridisierungen werden 0.1 - 0.5 µCi/ml Hybridisierungslösung (entspricht 37 - 185 KBq/ml) verwendet.

Unmittelbar bevor die nick-translatierte DNA in die Hybridisierungsreaktion eingesetzt wird, muß sie durch 10-minütiges

(1) PHARMACIA, Freiburg

(2) Die Probe muß möglichst vollständig in das Gelbett einwandern, bevor Elutionspuffer nachgegeben wird, sonst kommt es zu starker Peakverbreiterung und, auf Grund der kurzen Trennstrecke, zu unzureichender Peaktrennung.

Kochen bei 100°C aufgeschmolzen werden, damit einzelsträngige, hybridisierungsfähige DNA entsteht.

14.1.2 Markierung des 5'-Endes von Oligonukleotiden

Durch Übertragen der endständigen Phosphatgruppe von kommerziell erhältlichem γ - ^{32}P -dATP, durch das Enzym Polynukleotidkinase auf die 5'-OH-Gruppe der Oligonukleotide, wurden diese radioaktiv markiert.

Lösungen : 10 x Kinasierungspuffer : 500 mM Tris/HCl pH 7.6
100 mM MgCl_2
50 mM DTT
1 mM EDTA
1 mM Spermidin

TES - Puffer : siehe Seite 80

Kinasierungsansatz : 1 μl Oligonukleotid (ca. 15 pmol)
3 μl 10 x Kinasierungspuffer
15 μl γ - ^{32}P -dATP (ca. 21 pmol) (1)
(7000 Ci/mmol = 259 GBq/ μmol)
(1.4 pmol/ μl)
3 μl T4-Polynukleotidkinase (2)
(ca. 10 U/ μl)
8 μl Aqua bidest.

Mischen, abzentrifugieren und bei 37°C für 30 min inkubieren.

Abtrennung des nicht eingebauten ATP's:

Für eine neue Charge gereinigtes Oligonukleotid oder T4-Polynukleotidkinase muß die Einbaurate bestimmt werden. Dazu wird - analog zu Seite 80 - nicht inkorporierte Radioaktivität durch Gelfiltration abgetrennt. Da aber beispielsweise ein 20-mer Oligonukleotid nur ein Molekulargewicht von circa 6000 Dalton hat, reicht eine kurze Pasteurpipette für eine saubere Trennung

(1) NEN, Best.-Nr.: NEG-002Z

(2) BOEHRINGER MANNHEIM, T4-Polynukleotidkinase

nicht aus. Eine silikonisierte 5 ml Pipette (1), die einige Zentimeter oberhalb der obersten Markierung abgesägt wird, ist jedoch gut geeignet.

Die Pipette wird mit in TES-Puffer gequollenem und autoklaviertem Sephadex G-25 (2) gefüllt, mit 15 ml TES-Puffer äquilibriert und anschließend der Kinasierungsansatz chromatographiert. Fraktionierung und Bestimmung des Einbaus erfolgt wie auf Seite 80 beschrieben.

14.2 Hybridisierungstechniken

14.2.1 Herstellen der Lösungen

Für die Hybridisierungen werden zwei Lösungen benötigt:

(Prä-)Hybridisierungspuffer

6 x SSPE (3)
0.7 % Milchpulver (4)
1 mM ATP

Waschpuffer

2 x SSPE
0.2 % Milchpulver

Die Lösungen werden mit Aqua bidest. hergestellt und sterilfiltriert durch 0.2 µm-Filter. Vor dem Sterilfiltrieren werden sie für 10 min auf 68°C erhitzt. Dies dient zum einen dazu, DNasen zu inaktivieren und zum anderen erniedrigt sich dadurch die Viskosität der Lösungen so weit, daß sie innerhalb weniger Minuten filtriert werden können.

Das enthaltene Milchpulver ersetzt das häufig beschriebene und wesentlich teurere BSA, das zum Absättigen des NC-Filters benutzt wird. Es zeigten sich keine Nachteile gegenüber BSA.

Der Zusatz von ATP im Prähybridisierungs- bzw. Hybridisierungspuffer dient dazu, eventuell vorhandene Bindungsstellen für Mononukleotide auf dem NC-Filter abzusättigen. Kommerziell erhältliches ATP enthält immer einen Anteil radioaktiver Verunreinigungen, z.B. die Zerfallsprodukte, welche zu sogenann-

-
- (1) Noch einfacher ist es, eine sterilverpackte 5 ml Plastikpipette zu verwenden, da das Silikonisieren entfallen kann und auch das Abtrennen des Mundstücks leichter ist.
(2) PHARMACIA, Freiburg
(3) siehe Seite 66
(4) Als Lebensmittel vertriebenes Milchpulver (z.B. NESTLE) ist geeignet.

ten "Spots" führen. Zum anderen macht der relativ hohe ATP-Zusatz ein Abtrennen überschüssigen radioaktiven ATP's aus Kinasierungsreaktionen überflüssig, was das Verfahren stark vereinfacht und beschleunigt. Auf Grund des hohen molaren Überschusses an kaltem ATP wird, durch den Kinasierungsansatz eingeschlepptes markiertes ATP nicht mehr an den NC-Filter gebunden und führt nicht zu einer Erhöhung der Hintergrundschwärzung.

14.2.2 Hybridisierungen

Die Hybridisierungen werden in Plastiktüten durchgeführt. Die gängigen Gefrierbeutel für Lebensmittel eignen sich gut dazu. Vor ihrer Verwendung werden die Beutel mit Aqua bidest. gewaschen und mit Prähybridisierungspuffer inaktiviert.

Dazu füllt man 50-100 ml Prähybridisierungspuffer in eine Tüte, verschweißt sie und inkubiert sie für 15 min bei 68°C in einem Wasserbad. Danach wird die Tüte außen abgetrocknet, aufgeschnitten und der Prähybridisierungspuffer entleert.

Die nun feuchte Tüte wird an drei Seiten aufgeschnitten, um den Nitrocellulosefilter bequem einlegen zu können und anschließend an zwei Seiten möglichst nahe beim Filter verschweißt. Pro cm² Filterfläche fügt man 1 ml Prähybridisierungspuffer hinzu und verschließt die Tüte mit reichlich Abstand zum Filter. Das Einschweißen muß luftblasenfrei erfolgen.

Zur Prähybridisierung gibt man die Tüte in ein Wasserbad von 68°C, das man danach auf die Hybridisierungstemperatur herunterschaltet. Nachdem das Wasserbad die Hybridisierungstemperatur erreicht hat, jedoch nicht vor Ablauf von zwei Stunden, entnimmt man die Tüte, schneidet eine Ecke ab und entleert soviel Puffer wie ohne weiteres Zutun möglich ist, indem man die Tüte an einer Ecke hochhält. Die durch die Kapillaritätskräfte in der Tüte festgehaltene Flüssigkeitsmenge ist vollkommen ausreichend für die eigentliche Hybridisierung.

Für Hybridisierungen mit Oligonukleotiden wird der Kinasierungsansatz einfach dazupipettiert und die Ecke sofort wieder

zugeschweißt. Beim Einsatz von nick-translatierter DNA muß die zugesetzte DNA-Probe mit 20xSSPE auf eine Salzkonzentration von 6xSSPE eingestellt werden. Alle eventuell mit eingeschweißten Luftblasen sind sorgfältig in eine Ecke der Tüte zu drücken und diese dann knapp über dem NC-Filter abzuschweißen.

Zur Hybridisierung hält man den Gefrierbeutel für mindestens 3 h in dem temperierten Wasserbad vollständig unter Wasser getaucht. Danach öffnet man die Tüte und entleert die Flüssigkeit in den Abfall.

Das Filter wird entnommen und mit vortemperiertem Waschpuffer 3 x 20 min gewaschen. Dabei ist wiederum auf die Hybridisierungstemperatur zu achten. Eine große Gefrierdose, die in das Wasserbad gesetzt wird, hat sich als Behältnis für die Waschprozedur bewährt.

Um das Filter exponieren zu können, trocknet man es erst durch Abdrücken mit Filterpapier und anschließend im Luftstrom. Ein Fön mit abgeschalteter Heizung eignet sich sehr gut dazu. Es ist unbedingt darauf zu achten, daß das Filter dabei nicht über Raumtemperatur erwärmt wird, um sukzessive Waschschrte mit steigenden Temperaturen zu ermöglichen. Zu hohe Temperaturen, wie z.B. das häufig beschriebene Trocknen bei 60°C, führt zu einem teilweisen "Festbacken" der Hybridisierungsprobe und läßt somit keine signifikanten Aussagen mehr zu.

14.3 Autoradiographie

14.3.1 Filmmaterial und Verstärkerfolien

Zur Autoradiographie wurden konventionelle Röntgenfilme der Marke KODAK XAR 5 zusammen mit Verstärkerfolien CURIX MR 800 von AGFA verwendet.

14.3.2 Exposition

Zum Exponieren der Nitrocellulosefilter dienten Belichtungskassetten, wie sie für medizinische Röntgenaufnahmen üblich sind. Die Kassetten waren mit einem "Screen" auf der Rückseite

des Films bestückt. Zur Steigerung der Empfindlichkeit wird häufig ein zweiter "Screen" zwischen Filter und Film beschrieben. Dies führt wegen der nicht zu vernachlässigenden Dicke der Verstärkerfolie zu einem diffuswerden der Banden und wurde deshalb unterlassen. Auch ein "Blitzen" der Filme zur Empfindlichkeitssteigerung war nicht nötig.

Zum Belichten wurden sie bei -70°C für 1 - 100 h gelagert.

15. DNA - Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA geschah nach der Methode von MAXAM und GILBERT (1980). Die zu analysierende DNA war in pUC-Plasmiden kloniert und in den E. coli-Stamm JM105 transformiert.

15.1 Präparation der DNA-Fragmente

Plasmid-DNA wurde vermehrt und isoliert, wie auf Seite 74 beschrieben. Zur Reinheitskontrolle und Quantifizierung dienten UV-Spektren des Bereichs 220-320 nm.

Durch Erstellen von Restriktionskarten der klonierten Inserts mußten Schnittstellen zu beiden Seiten der zu sequenzierenden Bereiche aufgefunden werden. Häufig konnten für eine Seite Schnittstellen aus dem Polylinker des pUC-Plasmids verwendet werden.

Fragmente bis zu 500 bp können in einem Schritt sequenziert werden. Bei der Auswahl der Schnittstellen war zu berücksichtigen, daß diese Länge nicht überschritten wurde. Es erleichtert die Sequenzierungsschritte erheblich, wenn Restriktionsenzyme für die Fragmentpräparation gefunden werden können, die 5'-überhängende Enden erzeugen.

Puffer und Lösungen

10x CIP-Puffer

500 mM Tris/HCl pH 8.0
1 mM EDTA

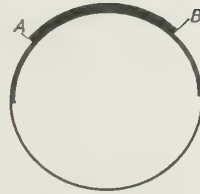
10x STE

100 mM Tris/HCl pH 8.0
10 mM EDTA
1 M NaCl

Arbeitsanleitung für die Fragmentpräparation

Intaktes Plasmid

Der zu sequenzierende Bereich ist lokalisiert. Die geeigneten Schnittstellen sind als "A" und "B" bezeichnet.



Wenn diese Informationen über den zu sequenzierenden Bereich vorliegen, kann nach folgendem Schema verfahren werden:

1) Restriktionsansätze

(je einen für die Enzyme A und B)

50 µg Plasmid-DNA

10 µl 10x Restriktionspuffer

50 U Restriktionsenzym

ad 100 µl Aqua bidest.

Linearisieren der
Plasmide



Inkubieren für 2 h bei 37°C (gilt für die meisten Enzyme)

Der Erfolg der Restriktionen wird auf einem Minigel überprüft. Zirkularisiertes Plasmid zeigt ein typisches Laufverhalten unter Ausbildung einer 3-bandigen Struktur und ist so leicht von geschnittenem Plasmid zu unterscheiden.

2) Entfernen der Restriktionsenzyme

ad 225 µl Aqua bidest.

25 µl 4 M LiCl

1 x extrahieren mit Phenol/CHCl₃/Isoamylalkohol = 25/24/1

1 x extrahieren mit CHCl₃/Isoamylalkohol = 24/1

3) Konzentrieren der DNA

+ 750 µl Ethanol abs.

20 min Ethanol/Trockeneis-Bad

15 min bei 4°C abzentrifugieren (15000 g)

Überstand vorsichtig abnehmen und 1 ml 70% Ethanol zum Waschen des Pellets zufügen

10 min zentrifugieren und Überstand abnehmen

Pellet im Vakuum trocknen (z.B. Speed Vac Concentrator)

4) Phosphatasebehandlung

DNA-Pellet in 45 µl Aqua bidest. aufnehmen

+ 5 µl 10x CIP-Puffer

+ 1 µl CIP-Verdünnung 1:3 (1)

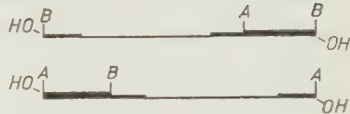
30 min. / 37°C

+ 1 µl CIP-Verdünnung 1:3

30 min. / 37°C

+ 1 µl CIP-Verdünnung 1:3

für 2 h in einem Styroporblock in den Kühlschrank



5) Abtrennen der Phosphatase

+ 40 µl Aqua bidest.

+ 10 µl 10x STE

+ 5 µl 10% SDS

15 min. / 68°C

2 x mit Phenol/Chloroform

1 x mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahieren

+ 300 µl Ethanol abs.

fällen, waschen und trocknen wie bei 3)

6) Gelelektrophorese

Meist entsteht bei der ersten Restriktion mehr als ein Fragment. Wenn dies nicht der Fall ist, kann dieser Schritt übersprungen werden.

Pellet in 40 µl Aqua bidest. aufnehmen

20 µl Agarose beads (2) zusetzen

auf 3 Taschen eines präparativen Gels verteilen

Elektrophorese, bis Banden gut getrennt sind

7) Extraktion der gewünschten DNA-Banden

wie auf Seite 61 beschrieben, je nach verwendetem Agarosetyp

(1) BOEHRINGER, alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
(Best.-Nr.: 713 023)

(2) siehe Seite 65

8) Kinasieren

Pellet in 40 µl Aqua bidest. aufnehmen

+ 5 µl 10x Kinasierungspuffer (siehe Seite 82)

+ 50 µCi γ - 32 P-dATP

+ 10 U Polynukleotidkinase

30 min / 37°C

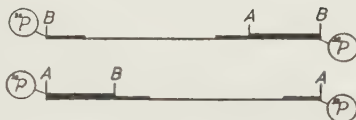
+ 2 µl 0.5 M EDTA

+ 175 µl Aqua bidest.

+ 25 µl 4 M LiCl

+ 750 µl Ethanol abs.

fällen, waschen, trocknen wie bei 3)



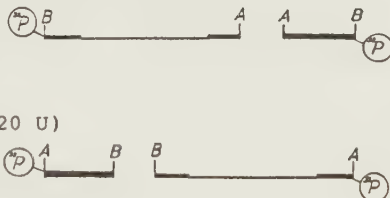
9) Nachschneiden der Fragmente

in 25 µl Aqua bidest. aufnehmen

+ 3 µl 10x Restriktionspuffer

+ 2 µl Restriktionsenzym (ca. 20 U)

1 h / 37°C

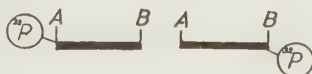


10) Gelelektrophorese und DNA-Extraktion

wie unter 6) und 7) beschrieben,

allerdings nicht die DNA fällen

15.2 Sequenzreaktionen



Folgende Lösungen werden benötigt:

Depumix

66 % Ameisensäure
2 % Diphenylamin
1 mM EDTA

DMS-Puffer

50 mM Na-cacodylat pH 8.0
1 mM EDTA

DMS-Mix

200 µl DMS-Puffer
1 µl DMS

DMS-Stop

1.5 M NaAcetat pH 7.0
1.0 M Mercaptoethanol
100 µg/ml Hefe tRNA

Hydrazin-Stop

0.3 M NaAcetat
0.1 mM EDTA
25 µg/ml Hefe tRNA

Formamid-Dye

80 % Formamid
15 mM EDTA
10 mM NaOH
0.1 % Xylencyanol
0.1 % Bromphenolblau

Fällmix

2 M LiCl
20 µg/ml Lachssperm-DNA

Zu der DNA-Lösung 50 µl Fällmix zugefügen, mit Aqua bidest. auf 500 µl ergänzen und auf die Reaktionen verteilen.

Optimierter Zeitplan für die Sequenzreaktionen

A + G	G	T + C	C
150 µl	100 µl	150 µl	100 µl
+ 750 µl Ethanol abs. -20°C, 10 min EtOH/CO ₂ -70°C abzentrifugieren bei 15000 g für 10 min bei 4°C Überstand vorsichtig abnehmen und auf Radioaktivität prüfen 1 ml 70 % EtOH -20°C zusetzen, 10 min abzentrifugieren			
+ 15µl Depumix 1 s zentrifug. 4 min / 25°C + 45µl H ₂ O 3 x mit Ether extrahieren lyophilisieren +20 µl H ₂ O 1 s zentrifug. lyophilisieren	+ 6µl H ₂ O 1 s zentrif. +201µl DMS-Mix 2.5 min / 25°C +50µl DMS-Stop in Eis stellen	+ 21µl H ₂ O 1 s zentrif.	+ 6µl H ₂ O 1 s zentrif. +15µl 5 M NaCl
		+ 30 µl Hydrazin 1 sec abzentrifugieren 4 min / 25°C + 200 µl Hydrazin-Stop	
	+5µl Hefe tRNS (1 µg/µl)	+ 750 µl EtOH abs. -20°C, 10 min EtOH/Trockeneis 10 min abzentrifugieren bei 4°C Überstand abnehmen und Radioaktivität messen	

Fortsetzung Sequenzreaktionen:

für alle Reaktionen:

+ 250 µl 0.4 M LiCl, mischen
+ 750 µl EtOH abs. -20°C, 10 min EtOH/Trockeneis
10 min abzentrifugieren bei 4°C
+ 1 ml 70% EtOH, abzentrifugieren für 5 min
im Vakuum trocknen
je 100 µl Piperidin 1:10 und 35 min 95°C
lyophilisieren
3 x in 100 µl Aqua bidest. aufnehmen und lyophilisieren

Aktivität pro Reaktion messen (Cerenkov-Zählung)

In Formamid-Dye so aufnehmen, daß sich die Aktivitäten/µl wie folgt verhalten:

$$A+G : G : T+C : C = 1.5 : 1 : 1.5 : 1$$

Schritte in der gleichen Zeile sollen gleichzeitig durchgeführt werden.

Die Zeiten sind genau einzuhalten, da es sich um statistische Reaktionen handelt.

15.3 Gelelektrophoretische Auftrennung der Reaktionsprodukte

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Produkte aus den Sequenzreaktionen dienten ultradünne Polyacrylamid/Harnstoff-Gele. Um möglichst weit die Sequenzen lesen zu können, wurden 6%- , 8%- und 20%-ige Gele benutzt. 6%- und 8%-Gele waren 0.2 mm dick, 20%-Gele 0.1 mm. Sie wurden nach der Schiebetechnik hergestellt.

Die Gele mit den Dimensionen 20 x 60 cm wurden während der Elektrophorese auf 60°C thermostatisiert (1).

Um ionische Verunreinigungen, die die Elektrophorese beeinflussen würden, abzutrennen, wurden die Gellösungen vor dem

(1) LKB, Macrophor-Vertikalelektrophorese-Einrichtung
bzw. technisch ähnliche der Universitätswerkstätten
München

Sterilfiltrieren mit 15 g Amberlite Mischbettaustauscher (1) entionisiert.

Gellösungen

	6 %	8 %	20 %	
Acrylamid	28.5 g	38 g	38 g	
Bisacrylamid	1.5 g	2 g	2 g	Alle Gellösungen sind 0,2 µm sterilfiltriert.
Harnstoff	210 g	210 g	84 g	
10xTBE	50 ml	50 ml	20 ml	
Aqua dem.	ad 500 ml	ad 500 ml	ad 200 ml	

Die Trägerglasplatte des Gels wird mit Bindsilan (2) aktiviert, damit dieses möglichst gut haftet; die Thermoplatte hingegen wird silikonisiert, um ein leichtes Abheben des Gels samt Trägerplatte zu gewährleisten.

Für die Gele werden folgende Zusammensetzungen benutzt:

	6 %	8 %	20 %
Gellösung	40 ml	40 ml	40 ml
10%-AmPer (3)	320 µl	320 µl	280 µl
TEMED	17 µl	15 µl	10 µl

Präelektrophorese

Vor dem Probenauftrag werden die Gele bei 2500 V Spannung und 60°C einer 1-stündigen Präelektrophorese unterzogen.

Elektrophorese

Kurz vor dem Probenauftrag müssen diese für 5 min bei 95°C aufgeköcht und danach in Eis abgekühlt werden.

Pro Spur werden 1 oder 2 µl Probenlösung aufgetragen.

Die Trennung wird bei 2500 V Konstantspannung durchgeführt und gestoppt, sobald

beim 6 %-Gel der Xylencyanol-marker 75 cm

beim 8 %-Gel der Bromphenolblau-marker 55 cm

beim 20 %-Gel der Bromphenolblau-marker 28 cm

zurückgelegt hat.

(1) SERVA, Heidelberg, Amberlite MB1

(2) LKB, Grärfelfing, (γ-methacryloxypropyltrimethoxysilan)

(3) 10 % Ammoniumperoxodisulfat in Aqua bidest.

Konservieren

Nach Ablösen der Gelplatten von der Thermoplatte werden sie zur Entfernung von Harnstoff in 10%-Essigsäure eingelegt. Da die Fragmente, die im 20%-Gel detektiert werden sollen, sehr klein sind, besteht bei diesen die Gefahr des Ausdiffundierens zusammen mit dem Harnstoff. Das 20%-Gel wird deshalb nur für 20 sec, die anderen für 10 min untergetaucht und danach sorgfältig mit Aqua demin. abgespült.

Um ein Reißen der Geloberfläche beim Trocknen zu verhindern, werden sie mit 10%-Glycerin eingesprüht.

Zum Trocknen stellt man die Glasplatten für 1 h aufrecht in einen auf 80°C thermostatisierten Umluftschrank.

15.4 Autoradiographie

Die trockenen Gele bedeckt man nach dem Abkühlen luftblasenfrei mit Haushaltsfolie und legt darauf einen Röntgenfilm des Formats 20x40 cm oder 20x50 cm, fixiert ihn durch Klammern mit einer zweiten Glasplatte und exponiert, je nach eingesetzter Aktivität, bei Raumtemperatur.

(Anhaltspunkt: bei 50000 cpm pro Spur (Cerenkov-Zählung)
15 h bei Raumtemperatur ohne Screen)

15.5 Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse ließ sich sehr vereinfachen durch Verwendung eines Computerprogramms.

Es wurde das Programmpaket

Sequence Analysis Version 3.0

Roger Larson, Steve Mestad, Joachim Messing
Department of Biochemistry, University of Minnesota

auf einem APPLE II - Computer unter dem Betriebssystem UCSD benutzt.

III. ERGEBNISSE

1. Wahl eines geeigneten Rohmaterials für die Isolierung der Strictosidinsynthase

Wie bei TREIMER (1979) und PFITZNER (1984) dargestellt, konzentriert sich das Vorkommen von Strictosidinsynthaseaktivität auf die Pflanzenfamilien der Apocynaceae und Rubiaceae.

Die pharmazeutisch wichtigsten Vertreter dieser Familien sind Catharanthus roseus, die man bei uns gelegentlich als Zierpflanze antrifft, und Rauwolfia serpentina, eine subtropische Pflanze die bei uns nur im Treibhaus gedeiht.

Von beiden existieren hier am Institut Hochleistungsstämme, die, gemessen an ihren zugehörigen Ganzpflanzen, eine vielfach höhere Produktion bestimmter Alkaloide aufweisen. Es gibt mehrere Möglichkeiten, diese Tatsache zu erklären:

- 1) Die Zellkulturen produzieren leistungsfähigere Enzyme, das hieße, in den Kulturen treten Mutationen der "Wildenzyme" auf.
- 2) Mechanismen zur Regulation der betreffenden Stoffwechselwege sind außer Funktion. Der hohe Alkaloidgehalt wäre also durch die fehlende Rückkopplung verursacht.
- 3) Die selektionierten Stämme produzieren die beteiligten Enzyme in höherer Menge und steigern so ihre Stoffwechselleistung.

Letztendlich kann man diese Frage noch nicht abschließend beantworten. Untersuchungen von TREIMER (1979) und DEUS (1980) deuten aber an, daß die dritte Variante der Wahrheit recht nahe kommen dürfte. DEUS zeigt, daß in C. roseus-Zellkulturen die Zahl der Chromosomen deutlich erhöht ist im Vergleich zur Wildpflanze. Sie stellt keine strenge Polyploidie fest, wie wir sie von vielen Kulturpflanzen mit ebenfalls auffälligen Stoffwechselleistungen kennen, sondern einzelne Chromosomen scheinen überrepräsentiert zu sein, andere treten nur als Fragmente auf. Diese Beobachtungen legen eine sehr einfache Erklärung nahe,

für die von TREIMER (1979) beobachtete Überproduktion von Enzymen des Alkaloidbiosyntheseweges.

TREIMER vergleicht die Synthaseaktivität intakter Pflanzen mit der von Zellkulturen von C. roseus und stellt fest, daß Zellkulturen knapp die

3-fache Strictosidinsynthaseaktivität / mg Gesamtprotein

aufweisen. Innerhalb der Proteinfraction ist also die Stritosidinsynthase überrepräsentiert. Eine mögliche und mit den von DEUS (1980) beobachteten auffälligen Unterschieden zwischen den Chromosomenzahlen und -formen von Zellen aus Suspensionskulturen und Zellen aus einer Ganzpflanze konsistente Erklärung ist die Annahme einer erhöhten Kopienzahl des zugehörigen Gens.

Weiter berichtet TREIMER, daß die untersuchten Suspensionskulturen, verglichen mit der Ganzpflanze, etwa die

2-fache Strictosidinsynthaseaktivität / g Trockengewicht

haben. Bedingt durch die Nahrungsquellen, Hormonverhältnisse und Kultivierungsbedingungen der Zellkulturen kommt es zu verminderter Produktion von Nichtproteinanteilen, wie z.B. Gerüstsubstanzen.

Die Bevorzugung der Proteinsynthese im allgemeinen und die Überrepräsentierung der Enzyme, die für die Synthese der Alkaloide nötig sind, auf deren Gehalt selektiert wurde, prädestinieren Zellkulturen als Ausgangsmaterial für die Isolierung der diese Stoffwechselwege katalysierenden Proteine.

1.1 Auswahl der Zellkulturstämme

Neben den vielen angeführten Vorteilen, die uns pflanzliche Zellkulturen erschließen, haben wir leider auch einige Nachteile in Kauf zu nehmen, die unsere Wahl einschränken.

Zellkulturen zur Verwendung bei längerfristigen Untersuchungen müssen bereits über viele Monate stabil sein, so daß man davon ausgehen kann, daß sie während des Zeitraums der Untersuchungen ihre Eigenschaften nicht verändern werden.

Außerdem kommen nur Kulturen in Frage, die ein ausreichend schnelles Wachstum aufweisen, d.h. für die bereits optimale Kultivierungsbedingungen gefunden sind.

Im vorliegenden Fall kamen folgende vier Stämme in die engere Wahl:

SR28	<u>Catharanthus roseus</u>
MT55	dito
RT71	dito
Tina30	<u>Rauwolfia serpentina</u>

1.2 Gehalt und Induzierbarkeit der Strictosidinsynthase-aktivität in verschiedenen Medien

Für die ausgewählten Kulturen wurde in einem ersten Screening die Gewebeausbeute und der Enzymaktivitätsgehalt in verschiedenen Medien untersucht.

Die Vorkulturen dazu wurden einheitlich in LS-Medium angezogen und die Zellen durch Vakuumfiltration steril geerntet.

Zum Animpfen der 1 l EMK dienten je 20 g der Gewebekuchen.

Die Ernte der Gewebe erfolgte nach 12 Tagen.

	Tina30			MT55			RT71			SR28		
	LS	Ri	AP	LS	Ri	AP	LS	Ri	AP	LS	Ri	AP
FG / L (g)	98	145	135	332	244	253	324	242	260	254	241	247
TG / L (g)	6.5	15	14	11	16	14	10	14	15	13	22	15
<u>PRO L MEDIUM</u>												
PROT (MG)	535	500	320	835	260	350	910	400	440	760	285	250
SS (NKAT)	82	147	113	20	13	9	9	12	8	15	20	21
<u>PRO G IG</u>												
PROT (MG)	83	33	23	76	17	25	94	28	30	57	13	17
SS (NKAT)	12.5	10	8	1.8	0.8	0.6	0.9	0.8	0.5	1.1	0.9	1.4
<u>SPEZ. AKT.</u>												
SA (PKAT/MG)	150	300	350	24	51	25	10	31	20	20	70	85
<u>INDUKTION.</u>												
IN (LS=1)	1	2	2.3	1	2	1	1	3	2	1	3.5	4.2

FG	=	FRISCHGEWICHT
TG	=	TROCKENGEWICHT
SS	=	STRICTOSIDINSYNTHESEAKTIVITÄT

Tab. 1 Strictosidinsynthase in verschiedenen Zellsuspensionskulturen und unterschiedlichen Medien

Aus Tab. 1 ist zu ersehen, daß Tina30 etwa 5 - 10-mal mehr Strictosidinsynthaseaktivität in der Gesamtproteinfraktion enthält als die C. roseus-Kulturen.

Es ist nicht entscheidbar, ob die enthaltene Synthase in Tina30 in höherem Anteil im Gesamtprotein vorliegt als bei den anderen Kulturen, oder ob sie eine höhere spezifische Aktivität als die Catharanthus-Synthase aufweist.

PFITZNER (1984) hatte aus SR28 die Synthaseaktivität bereits charakterisiert und festgestellt, daß dieses Protein dort in multiplen Formen, bzw. 3 - 7 Isoenzymen, vorliegt.

Durch Medienwechsel läßt sich bei keiner der untersuchten Kulturen ein auffälliger Anstieg der Synthaseaktivität induzieren; Steigerungen auf das 2 - 4-fache wurden gemessen.

Beobachtungen bei der Anzucht der Rauwolfia-Kultur zeigten, daß sie nicht auf Dauer in Ringe-Medium kultivierbar ist. Trotz niedrigeren Enzymgehalts fiel die Wahl deshalb auf LS-Medium als Kulturmedium.

Die Rauwolfia serpentina - Kultur Tina30 war von den untersuchten Kulturen, auf Grund obiger Befunde, das vielversprechendste Rohmaterial für die Isolierung der Strictosidinsynthase.

2. Anzucht von Pflanzenmaterial

Für die Reinigung mehrerer Milligramm der

Rauwolfia serpentina Strictosidinsynthase = **TiSS**

errechnet sich, basierend auf den Ergebnissen des vorhergehenden Kapitels, daß einige Kilogramm Gewebematerial aufgearbeitet werden müssen. Um diese Mengen kontinuierlich und ohne großen Aufwand bereitstellen zu können, mußte eine leistungsfähige und zuverlässige Möglichkeit für die Gewebeanzucht erarbeitet werden.

2.1 Auswahl der Kulturgefäße

Für Suspensionskulturen werden üblicherweise Erlenmeyerkolben von 100 ml - 5 l Fassungsvermögen, mit 10 - 1000 ml Medium, verwendet.

Für größere Gewebemengen sind diverse Fermentertypen beschrieben, die für den Labormaßstab 20 - 50 l Medium fassen. Zur Verfügung stand ein 30 l Airliftfermenter, mit dem einige Fermentationen der Kulturen Tina30 und SR28 durchgeführt wurden.

Ein Vergleich der mit verschiedenen Kulturen erreichbaren Gewebemenge pro Liter Medium im Airliftfermenter und in 1 l EMK zeigt eine deutliche Überlegenheit des Schüttelkolbens.

Sowohl der Fermenter als auch 1 l EMK wurden mit einem Inoculum, das 10 % des Mediumvolumens entsprach, angeimpft. Nach 13 Tagen Kultivierung in LS-Medium wurde das jeweils erreichte Trockengewicht pro Liter Medium des Gewebematerials ermittelt.

g TG / l Med.	Airliftferm.	1 l EMK
Tina30	6.3 g	18 g
SR28	5.8 g	17 g

Tab. 2 Vergleich der Gewebeausbeuten von Zellkulturen aus Airliftfermenter und Schüttelkolben

Animpfdichte	: 10 % (G/V) des Mediums
Medium	: LS - Medium
Temperatur	: 27 Grad Celsius
Dauer	: 13 Tage

In EMK konnte mit den hier untersuchten Kulturen in der gleichen Zeit jeweils etwa die 3-fache Gewebemenge erzielt werden.

Sicherlich wären die Kultivierungsbedingungen im Fermenter noch zu verfeinern gewesen, die Leistungen der Schüttelkolben zu erreichen erschien jedoch unwahrscheinlich.

Einige Kilogramm Gewebe anzuziehen ist mit 1 l EMK recht umständlich; EMK größeren Volumens erreichen aber nicht immer die

gleichen Gewebeausbeuten. Auf Grund der Geometrie nimmt die Flüssigkeitsoberfläche bei Maßstabsvergrößerung langsamer zu als das Flüssigkeitsvolumen, d.h. die Gasaustauschkapazität vermindert sich. Ist diese ein limitierender Faktor, so ist ein Scale-up in Erlenmeyerkolben nur unter Beeinträchtigung der Gewebeausbeute möglich.

Bei gleicher Mediumkapazität von 1.25 l bieten Fernbachkolben eine größere Gasaustauschfläche als 5 l Erlenmeyerkolben.

Eine Vergleichsfermentation in Fernbachkolben und Erlenmeyerkolben sollte zeigen, ob der FBK, bei größerem Volumen, dem 1 l EMK vergleichbare Erträge Gewebekulturen erbringt.

Dazu wurden jeweils aus einer Vorkultur je ein FBK und ein 1 l EMK angeimpft (je 3 Parallelansätze mit Tina30 und RT71). Nach 14 Tagen wurde geerntet und die Erträge verglichen.

	FBK	1 l EMK	FBK/EMK
Volumen - Medium	: 1300 ml	300 ml	
- Inoculum	: 100 ml	75 ml	
- Gesamt	: 1400 ml	375 ml	3.7
Inoc. / Gesamt v. %	: 7 %	20 %	0.36
Frischgew.	: 480 g	145 g	3.3
- pro l	: 343 g	390 g	
Trockengew.	: 21.4 g	6.2 g	
- in % FG	: 4.5 %	4.2 %	
- pro l	: 15.3 g	15.3 g	1 (!)

Tab. 3 Vergleich der Fermentationserträge von Zellkulturen in FBK u. 1 l EMK

Mit beiden Kolbentypen wurden gleiche Ergebnisse an Trockengewicht/Liter Medium erzielt; die FBK hatten jedoch nur ein Drittel der Animpfdichte der EMK, d. h. die Kulturen in FBK sind sogar schneller gewachsen als die in EMK. Außerdem wird pro FBK, bei gleichem Arbeitsaufwand, die 3-fache Gewebemenge pro Arbeitsgang erzeugt.

Basierend auf obigen Daten wurde errechnet, wieviele Einzelfermentationen nötig sind um 1 kg Trockengewicht der beschriebenen

Kulturen zu erzeugen. Ein für die praktische Arbeit ebenfalls sehr wichtiger Parameter ist, welches Volumen an Kulturgefäßen dazu sterilisiert werden muß (entspricht Sterilvolumen in Tab. 4 und Abb. 14).

Kultur- gefäß	Medium Vol.	% Medium/ Gefäßvol.	Gefäße pro kg TG	Sterilvol. pro kg TG
1 l EMK	0.25 l	25 %	260	260 l
5 l EMK	1.25 l	25 %	53	260 l
FBK	1.25 l	70 %	53	95 l
30 l Ferm.	20 l	66 %	8	240 l

Tab. 4 Fermentationsaufwand mit verschiedenen Kulturgefäßen zur Produktion von 1 kg Trockengewicht Gewebematerial

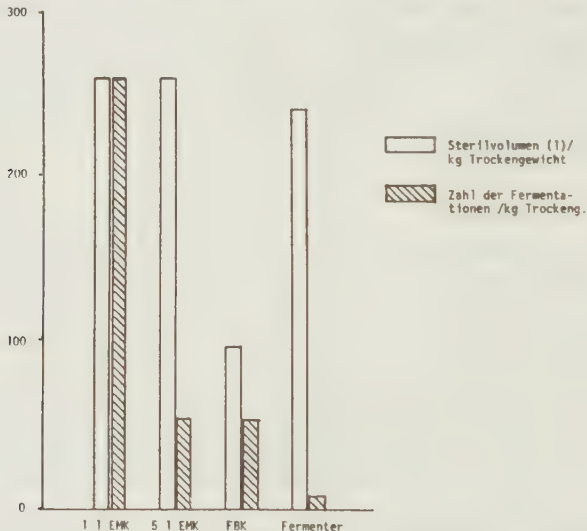


Abb. 14 Sterilvolumen und Zahl der Einzelfermentationen zur Produktion von 1 kg Trockengewicht Zellgewebe

Man sieht, daß mit etwa 6 FBK die gleiche Gewebemenge zu erzielen ist wie mit einer Fermenterbeladung.

Im Labormaßstab, d.h. bis zu 100 Liter Mediumvolumen, ist die Verwendung von Fernbachkolben eine wirtschaftliche Alternative zum Fermentereinsatz und diesem bei kleineren Volummen eindeutig überlegen.

Mit Fernbachkolben ist der Bereich von 0.5 - 50 kg Gewebe pro Fermentationszyklus abdeckbar.

Zusammenfassend sprechen folgende Gründe für den Einsatz von Fernbachkolben zur Produktion von Gewebe im Labormaßstab:

- bei den untersuchten Kulturen werden wesentlich höhere Gewebeerträge pro Liter Medium in FBK erzielt als im Fermenter
- unabhängig von der verwendeten Kultur gilt jedoch
- es sind keine technischen Einrichtungen nötig, die nicht für die Arbeit mit kleineren Kolben schon vorhanden sein müssen
 - die Handhabung ist wesentlich einfacher als der Umgang mit einem Fermenter
 - der technische Betriebsaufwand ist gering, ständige Kontrollen entfallen
 - das Infektionsrisiko ist, bedingt durch die einfachere Technik, geringer als beim Fermenter
 - der Infektionsschaden ist begrenzt auf einen Bruchteil des Gesamtertrags

Für die Gewebeanzucht im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Fernbachkolben eingesetzt; sie haben sich inzwischen auch für viele andere Zellkulturstämme über lange Zeit bewährt.

2.2 Methode zur zerstörungsfreien Bestimmung der Wachstumsphase

Für die Isolierung eines bestimmten Enzyms muß der zeitliche Verlauf der Enzymaktivität in der ausgewählten Zellkultur festgestellt werden, um das Gewebe zum optimalen Zeitpunkt ernten zu können.

Gehaltsangaben für ein bestimmtes Enzym sind mit spezifischen Enzymtests präzise zu ermitteln.

Schwierig ist es jedoch, Suspensionszellkulturen exakt reproduzierbar anzuziehen, weshalb die Beurteilung von Eigenschaften

einer Produktionskultur aus den Ergebnissen einer Kinetik nur unter Vorbehalt möglich ist.

Suspensionszellkulturen werden vermehrt durch steriles Überführen von Zellsuspension aus einer Vorkultur in einen mit Nährmedium gefüllten Kolben. Das muß, um das Infektionsrisiko klein zu halten, rasch geschehen und ist der Hauptgrund, warum dieser Vorgang nicht reproduzierbar zu gestalten ist und immer vom Experimentator abhängig sein wird. Die Animpfdichte legt jedoch entscheidend fest, wie schnell eine Kultur wächst und wann sie den Zeitpunkt maximaler Enzymaktivität erreichen wird.

2.2.1 Konventionelles Kinetikverfahren

Im folgenden ist der Ablauf einer konventionellen Kinetik beschrieben. Bei den einzelnen Arbeitsschritten sind die daraus resultierenden Unsicherheiten angemerkt:

- 1) Abernten einer Vorkultur unter Sterilbedingungen
 - Dieser Schritt entfällt bei Produktionskulturen.
- 2) Einwiegen gleicher Mengen des Gewebekuchens in die Kulturkolben der Kinetik
 - Innerhalb des Gewebekuchens ist der Wassergehalt unterschiedlich, was beim Einwiegen aber nicht berücksichtigt werden kann.
 - Die mechanische Beanspruchung der Zellen bei dieser Prozedur ist hoch.
 - Abgestorbene, beim Beimpfen beschädigte und andere nicht lebensfähige Zellen können nicht getrennt erfaßt werden.
 - Diese Animpftechnik hat ein hohes Infektionsrisiko, da lange mit offenliegendem Zellgewebe gearbeitet werden muß und viele Einzelmanipulationen nötig sind.
- 3) Ernten der einzelnen Kolben nach verschiedenen Zeiten und Durchführung des Enzymtests
 - Alle Aussagen über die Kultur können erst nach dem Abernten der Kultur gemacht werden.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Kinetik werden die Gewebeproduktionsbedingungen festgelegt, was folgende Unwägbarkeiten mit sich bringt:

- Bei der Vermehrung zu Produktionszwecken wird mit Zellsuspension angeimpft, was eine grundsätzlich andere Vorgehensweise darstellt wie bei der Kinetik.
Die Ernte der Zellkulturen erfolgt jedoch nach den Ergebnissen der Kinetik.
- Die Zelldichte beim Animpfen der Kulturen hängt ausschließlich von subjektiven Kriterien des Experimentators ab.
Die Animpfdichte bei Produktionskulturen ist meist höher als bei Kinetikkulturen.

Das führt zu einer hohen Streuung der Einzelkulturen, was bedeutet, daß insbesondere schnelle oder kurzfristige Veränderungen einer Zellkultur mit einer solchen Kinetikmethode nicht erfaßbar sind.

Beispiele für solche Vorgänge in Zellkulturen sind nur kurzfristig auftretende Proteine und die induzierte Transkription von Genen.

2.2.2 Theoretische Grundlagen für eine Methode zur zerstörungsfreien Bestimmung der Wachstumsphase

An eine neue Technik für die Gewebeoptimierung und Produktionskontrolle mußten folgende Anforderungen gestellt werden:

- Animpf-, Kultivierungs- und Erntetechnik müssen für Kinetik- und Produktionskulturen identisch sein.
- Es müssen leicht zugängliche Meßgrößen abgeleitet werden, die in kausalem Zusammenhang mit der Wachstumsphase einer Zellkultur stehen.
- Die Methode muß geeignet sein, die Produktion größerer Gewebemengen zu kontrollieren.
- Es dürfen keine Meßgrößen verwendet werden, die nur für einzelne Zellkulturen gelten, wie z.B. Farbe.

Zwei elementare Größen die eine Suspensionszellkultur charakterisieren, boten sich an:

- Viskosität
- Energieumsatz

Die Viskosität einer Zellkultur erlaubt eine unmittelbare Aussage über die Zelldichte einer Kultur; sie ist aber auch abhängig von der Art der Zellaggregate, die ein bestimmter Zellkulturstamm ausbildet. Deshalb sind Ergebnisse nicht ohne weiteres von einem Zellkulturstamm auf den anderen übertragbar.

Überdies sind Viskositätsmessungen technisch aufwendig.

Das elementarste Charakteristikum ist der Energieumsatz einer Zellkultur.

Die universelle Brennstoff- und Kohlenstoffquelle der Kulturen ist die im Medium enthaltene Saccharose. Durch Hydrolyse der Saccharose entstehen Glukose und Fruktose, die über die Glykolyse und den Zitronensäurezyklus verwertet werden.

Zum einen werden daraus die Grundbausteine für den Aufbau neuer Zellen bereitgestellt, zum andern wird der Energiebedarf der Kultur gedeckt.

Dazu werden die Zuckerbestandteile unter Aufnahme von Sauerstoff bis zu Kohlendioxid und Wasser abgebaut.

Das Verhältnis von Sauerstoffaufnahme zu Kohlendioxidabgabe, der Atmungsquotient, ist typisch für die in einem Organismus beschrittenen Stoffwechselwege.

Die absolute Gasaustauschmenge steht in direktem Zusammenhang mit der Zahl der lebenden, Stoffwechsel betreibenden Zellen.

Beim Saccharoseabbau entsteht bis hin zum Acetyl-CoA neben den energiereichen Intermediaten ATP und $\text{NADH} + \text{H}^+$ nur noch Kohlendioxid, welches freigesetzt wird. Für keinen Schritt ist exogener Sauerstoff nötig.

Im Zitronensäurezyklus und in der Atmungskette wird Kohlendioxid jedoch nur unter gleichzeitiger Fixierung von Sauerstoff gebildet (vgl. Abb. 15).

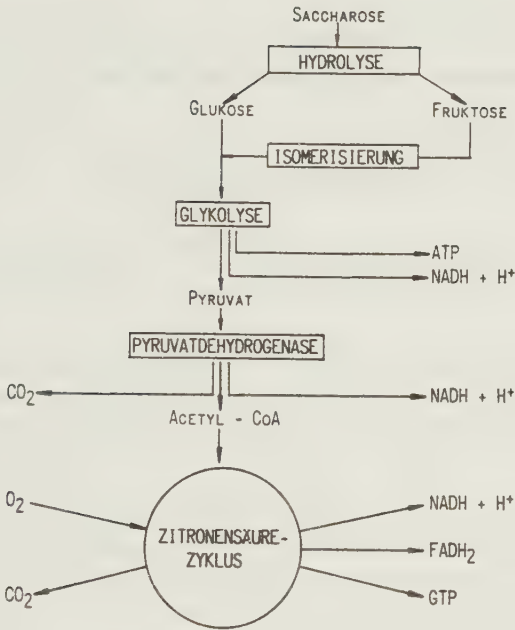


Abb. 15 Schematische Darstellung der Saccharoseverwertung
(Für die Stöchiometrie der Kohlenhydratverwertung
vgl. REINHARD (1978))

Mit dem abgegebenen Kohlendioxid geht Materie aus der flüssigen in die gasförmige Phase über und entweicht. Die Summe von direkter Kohlendioxidbildung und Freisetzung unter Sauerstoffverbrauch läßt sich als Massenverlust der Kultur messen.

Das Verfolgen der Gewichtsabnahme gibt uns direkten Aufschluß über die Menge der bereits verbrauchten Saccharose und den aktuellen Energieumsatz.

Damit haben wir eine Meßgröße zur Verfügung, die direkte Aussagen über die Wachstumsphase einer Einzelkultur erlaubt.

2.2.3 Technische Durchführung

Unter Berücksichtigung obiger Überlegungen wurde ein Kinetikverfahren entwickelt, das bei gleicher Methodik erlaubt,

nur Kulturüberwachung
oder Kulturüberwachung und Zellanalytik

durchzuführen.

Die reine Kulturüberwachung dient zur Feststellung des Wachstumszustandes einer Kultur, charakterisiert durch ihren Energieverbrauch.

Um die Korrelation zu endogenen Zuständen der Zelle, z.B. Enzymaktivitäten oder Gehalt an Biosyntheseprodukten, herzustellen, müssen regelmäßig Proben entnommen und analysiert werden.

Ist der Zusammenhang der untersuchten Eigenschaften mit der Meßgröße Gewichtsabnahme einer Kultur geklärt, kann über diese leicht zugängliche Größe die Produktionskontrolle und -optimierung abgewickelt werden.

Den Anteil der Gewichtsabnahme, der zurückzuführen ist auf die Wasserverdunstung, bedingt durch das Gefälle der relativen Luftfeuchtigkeit vom Kolbeninnern zur Klimakammer, berücksichtigt man, indem man einen unbeimpften Kolben als Referenz verwendet.

Die praktische Anwendung für eine Kultur erfolgt in drei Schritten:

- 1) Beobachtung des Kulturgewichts bis in die stationäre Phase. Daraus leitet sich die maximal erreichbare Gewichtsabnahme ab.
- 2) Um die Abhängigkeit z.B. einer bestimmten Enzymaktivität vom Massenverlust der Kultur zu ermitteln, wird eine Kinetik mit regelmäßiger Probennahme und -analyse durchgeführt.
- 3) Zur Gewebeproduktion werden die Kolben regelmäßig gewogen und an Hand der ermittelten Kennlinien entschieden, ob der optimale Erntezeitpunkt erreicht ist.

In der ersten Phase wird der Atmungsquotient einer Kultur bestimmt. Er charakterisiert die Summe aller Stoffwechselwege, die eine Zelle in einem bestimmten Medium betreibt.

Die verwendeten Medien haben alle Saccharose als Brennstoffquelle, so ist die Glykolyse der dominierende Stoffwechselweg für die Energieerzeugung. Würde eine Kultur, bedingt durch Gabe von veränderten Pflanzenhormongemischen oder anderen Energielieferanten wie Fetten (Atmungsquotient 0.7) oder Proteinen (Atmungsquotient 0.8) alternative Wege beschreiten, würde man das hiermit feststellen.

In der zweiten Phase wird die Korrelation der untersuchten Parameter zur Meßgröße Gewichtsabnahme hergestellt.

Es sind gegenüber der ersten Phase nur einige Schritte hinzugefügt; die Kultivierungsbedingungen bleiben unverändert und identisch mit denen der Gewebeproduktion.

Die dritte Phase beinhaltet die kontrollierte Gewebeproduktion. Da das Kolbengewicht sehr leicht zu erfassen ist, wird faktisch mit jeder Einzelkultur eine Kinetik durchgeführt.

Die Arbeitsabläufe der drei Phasen, dargestellt als Flußdiagramme (Abb. 16), zeigen, daß der Kernzyklus immer gleich bleibt.

So ist sichergestellt, daß die Ergebnisse der enzymatischen Untersuchungen auch für Produktionskulturen Gültigkeit haben.

Da die Qualität der Ergebnisse der zweiten Phase unmittelbar mit der reproduzierbaren Durchführung der Entnahme- und Analyseschritte verknüpft ist, sind nachfolgend für diese Operationen genaue Arbeitsanleitungen mit allen zu erfassenden Gewichten und Volumen angegeben.

Vorausgesetzt werden einheitlich gefüllte und autoklavierte Fernbachkolben.

Als Kulturgefäß wurde hier immer ein Fernbachkolben impliziert. Das ist zum einen darauf begründet, daß alle Messungen in den geplanten Produktionsgefäßen durchgeführt werden müssen, und

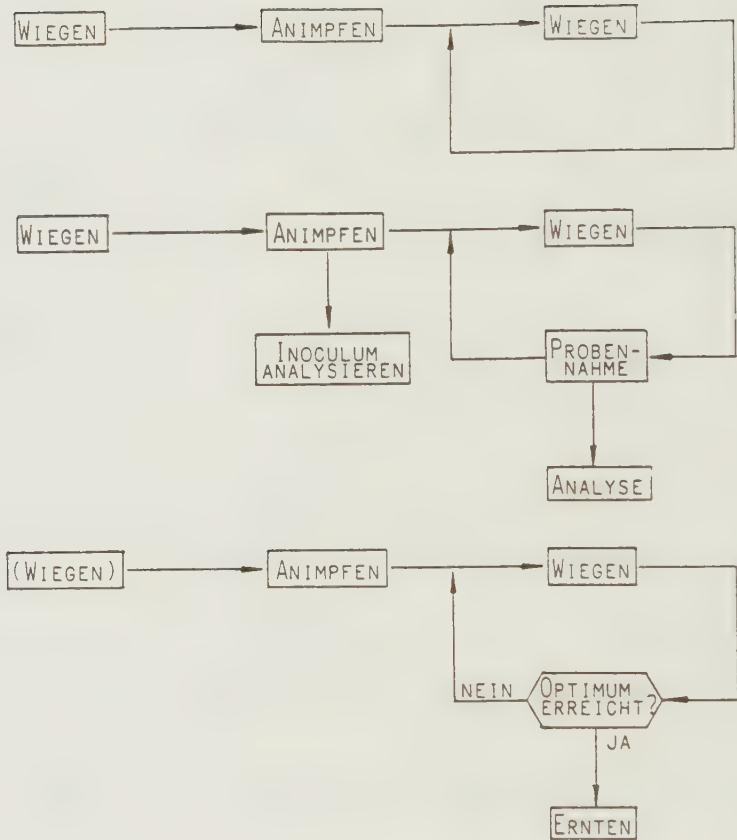


Abb. 16 Flußdiagramme für die drei Phasen der Gewebeproduktion mit zerstörungsfreier Messung des Wachstumszustandes

zum anderen sind die mit FBK beobachteten Gewichtsänderungen mit einer normalen Laborwaage, die einen Wägebereich bis 3000.0g hat, mit ausreichender Genauigkeit bequem zu messen.

Prinzipiell ist aber jedes andere Kulturgefäß, das den Gasaustausch mit der Umgebungsatmosphäre erlaubt, ebenfalls geeignet; kleinere Kolben erfordern jedoch genauere Waagen.

Animpfen einer Kinetikkultur

steril		FBK unbeimpft m. Stopfen wiegen Mediumvolumen im FBK	FG(1) FV(1)
		EMK gut umschütteln! Beimpfen (wie bei Gewebeproduktion)	
		FBK beimpft m. Stopfen wiegen	FG(2)
		Meßzylinder leer wiegen	ZG(0)
		Die im EMK verbliebene Suspension in den Meßzylinder überführen	
		Volumen ablesen Gewicht bestimmen	ZG(1) ZV(1)
		Den Meßzylinderinhalt mit einer Nutsche in Medium und Zellen trennen	
		Becherglas leer wiegen	BG(0)
		Zellen aus Nutsche in Becherglas überführen und wiegen	BG(1)
		Petrischale leer wiegen	PG(0)
		5 - 10 g Zellgewebe aus dem Becherglas in die Petrischale (Trockengewichtsbestimmung)	PG(1) PG(2)
		Medium in Meßzylinder zurück- schütten	
		Volumen ablesen Gewicht ablesen	ZV(2) ZG(2)

steril		Probennahme aus Kinetikkultur	
		(laufende Nr.: N)	
		FBK vor Entnahme wiegen	FG(3N)
		FBK gut umschütteln! 10 - 20 ml Suspension entnehmen	
		FBK nach Entnahme wiegen	FG(3N+1)
		25 ml Meßzylinder leer wiegen	ZG(3N)
		entnommene Suspension in den Meßzylinder Gewicht bestimmen Volumen ablesen	ZG(3N+1) ZV(3N)
		Zellsuspension aus Meßzylinder mit Nutsche in Medium und Gewebe trennen	
		Medium in Meßzylinder zurück Gewicht ablesen Volumen bestimmen	ZG(3N+2) ZV(3N+1)
		Für die Analyse des Mediums eine Probe abfüllen	
		Petrischale leer wiegen	PG(3N)
		Gesamtzellmaterial aus Nutsche in Petrischale und wiegen	BG(N+2)
		Für die Gewebeanalyse einen Teil in eine 50 ml Kautexflasche überführen und mit N ₂ liqu. schockgefrieren	
		Petrischale wiegen (Trockengewichtsbestimmung)	PG(3N+1) PG(3N+2)

2.2.4 EDV - Auswertung

Auf Grund der Fülle von Einzeldaten, insbesondere in der zweiten Phase, bietet sich eine EDV - unterstützte Auswertung an. Selbstverständlich kann jeder Verfahrensschritt auch manuell durchgeführt werden; die EDV-Auswertung stellt ausschließlich eine Erleichterung dar und ist nicht unabdingbar mit der Methode verknüpft.

Im folgenden sind alle Schritte erklärt, die für die Auswertung von Hand oder mit EDV erforderlich sind.

Es werden folgende Bezeichnungen verwendet:

- T Zeitpunkt der Messung
G Gewicht eines Kolben in g
GN, GZ, GD werden im Text erklärt

Indizes zur Kolbenidentifizierung

- M Nr. des Kolbens
M = 0 Referenzkolben
N lfd. Nr. der Messungen
N = 0 Startwert (unmittelbar nach Beimpfen)
P = 0 vor der Entnahme
P = 1 nach der Entnahme

Phase 1

Je ein Referenzkolben und M Kulturkolben werden regelmäßig gewogen. Bei jedem Wägezyklus erhält man eine Liste von Gewichten, die man in einer Matrix anordnet.

	0	1	2	3	4 M Kolbennr.
0	1500.0	2000.0	2010.0		
1	1499.0	1999.0	2008.8		
2	1498.0	1997.5	2007.0		
3	1497.0	1996.0	2004.8		
.					
N					

G(N,M) , T(N)

Aus dieser Matrix errechnet sich die Nettogewichtsabnahme des M-ten Kolben im N-ten Intervall zu:

$$GN(N,M) = G(N-1,M) - G(N,M) - G(N-1,0) + G(N,0)$$

Daraus ergibt sich eine neue Matrix, die die aufsummierte Nettogewichtsabnahme jedes Kolben enthält:

$$GZ(N,M) = GZ(N-1,M) + GN(N,M)$$

	T	1	2	3	4	M Kolbennr.
0	0	0.0	0.0			
1	24	0.0	0.2			
2	48	0.5	1.0			
3	72	1.0	2.2			
.				GZ(N,M)		
N				GZ(N,0) = Laufzeit d. Kinetik		

Da die Spalte M = 0 freibleibt, bietet es sich an, hier den Zeitpunkt der N-ten Messung als Differenz in h, gerechnet vom Animpfzeitpunkt, einzutragen.

Eine graphische Darstellung dieser Tabelle zeigt den, um die Wasserverdunstung bereinigten Gewichtsverlauf des Kolben.

Wenn man mit EDV auswertet, kann ohne Mühe noch die differenzielle Gewichtsabnahme des Kolben errechnet werden.

Ihre Werte werden ebenfalls als Komponenten einer Matrix berechnet.

$$GD(N,0) = (GZ(N,0) + GZ(N-1,0)) / 2$$

$$GD(N,M) = (GZ(N,M) - GZ(N-1,M)) / (GZ(N,0) - GZ(N-1,0)) + GD(N-1,M)$$

Die graphische Darstellung von GD stellt die erste Ableitung der Wachstumskurve nach der Zeit dar.

Da die beiden Matrizen GD und GZ jeweils aus der Matrix G(N,M) und dem Zeitvektor T(N) wieder konstruiert werden können, werden sie nicht gespeichert sondern bei Bedarf neu berechnet. Das verlangsamt das Programm, spart aber viel Diskettenkapazität.

Auswertung

Aus der graphischen Darstellung von $GZ(N,M)$ entnimmt man die maximal erzielbare Gewichtsabnahme, die auf die Abgabe von Kohlendioxid zurückzuführen ist. Sie hängt vom Zuckergehalt des Mediums, vom Volumen des vorgelegten Mediums und vom Atmungsquotienten der Kultur ab.

Setzt man beispielsweise die Werte von LS-Medium (3 % Saccharose) voraus, so ist bei einem Atmungsquotienten von 1 ein Gewichtsverlust von 12 g pro Liter LS-Medium durch die Massendifferenz zwischen abgegebenem Kohlendioxid und aufgenommenem Sauerstoff zu erwarten.

Phase 2

Es ist bereits bekannt, wie hoch der Gesamtnettomassenverlust liegen wird und wie schnell eine Kultur die stationäre Phase erreicht.

Damit läßt sich die Gesamtdauer der Kinetik festlegen.

Bei jedem Meßpunkt wird eine Probe von ca. 1 % des Gesamtvolumens entnommen. Bei etwa 20 Entnahmen geht der Kultur dementsprechend 20 % ihrer Substanz verloren.

Da jedoch alle Daten auf einen Liter Medium umgerechnet werden, kommt es zu keinen Verfälschungen der Ergebnisse.

Für die Gewichtstabelle bedeutet die Entnahme, daß jeweils ein Meßwert vor Entnahme und einer nach Entnahme bestimmt werden muß.

$G(N,M,P)$ mit $P = 0$ Gewicht vor Entnahme

$P = 1$ Gewicht nach Entnahme

$T(N)$ Entnahmezeiten

Ähnlich wie oben errechnet sich die Nettogewichtsabnahme der Kolben:

$$GN(N,M) = G(N-1,M,1) - G(N,M,0) - G(N-1,0,0) + G(N,0,0)$$

Die Berechnung von GZ und GD erfolgt wie bei Phase 1.

Die entnommene Probe wird analysiert und die Ergebnisse maßstabsgerecht in die Gewichtskurve eingezeichnet. Daraus ist der gesuchte Zusammenhang zwischen Gewichtsabnahme und beispielsweise einer Enzymaktivität abzulesen.

Phase 3

Die Kolben werden regelmäßig gewogen und sobald das in Phase 2 abgeleitete Optimum erreicht ist geerntet.

Programmbeschreibung

Im Anschluß ist der Quelltext eines Programms angegeben, das die Verwaltung der Daten, insbesondere für eine größere Zahl von Kolben, erleichtert. Es führt alle oben angegebenen Operationen durch, kann die Ergebnisse graphisch darstellen und auf einen Matrixdrucker ausgeben.

Es wurde darauf geachtet, daß es mit einem Minimalaufwand an Geräten lauffähig ist.

Benötigt werden: Apple II od. Apple II+ od. Apple IIe
 oder ein kompatibler Rechner
 2 Disketten-Laufwerke
 S/W-Monitor
 Epson-Graphik Interface (Slot1)
 Matrixdrucker (Epson-kompatibel)

Auf die Verwendung einer 80-Zeichen-Karte wurde verzichtet, damit es ohne Programmänderungen mit allen Apple-Versionen direkt einsetzbar ist.

Es ist in Applesoft-Basic geschrieben und kann direkt abgetippt werden. Mit dem Befehl

SAVE Programmname

wird es auf der angemeldeten Diskette abgespeichert. Mit

RUN Programmname

kann es gestartet werden (vgl. DOS 3.3 - Handbuch, Apple)

Für die Graphikausgabe der 2. Graphikseite wird die Hardware-routine des Druckerinterfaces benutzt.

Für Interfacetypen anderer Hersteller müssen hier eventuell geänderte Steuerzeichen verwendet werden. Die betreffende Stelle ist im Programm besonders kommentiert.

Bei Änderungen des Programms muß beachtet werden, daß die Graphikseite 1 nicht benutzt werden kann, da sie auf Grund der Länge des Programms von diesem teilweise belegt wird.

Ausblick

Für große Kolbenzahlen und routinemäßigen Einsatz wäre es denkbar, die Kolben mit autoklavierbaren Strichcodeetiketten zu versehen und die Identifizierung der Kulturen mit einem Barcodelesestift durchzuführen. Verwendet man dazu noch eine Waage mit Computerschnittstelle entfällt jeder Aufwand für die Datenerfassung.

Das Programm ist bereits dafür vorbereitet. Über den Bildschirm eingegebene Daten werden in einem Eingabevektor zwischengespeichert und erst dann in die Datenmatrizen kopiert. Auf diesen Zwischenspeicher kann auch von Eingabegeräten wie z.B. Waage und Lesestift zugegriffen werden.

ÜLIST

```

10 REM NDG.W
20 REM VERSION 2.3
30 REM 11.3.85 / NH
50 TKA = 0: REM DIM-ZEIGER
100 REM STARTSCHIRM
105 HOME
110 PRINT : PRINT : PRINT
120 PRINT : TAB( 5) "NONDESTRUCTIV
125 PRINT "DETERMINATION OF"
130 PRINT : PRINT TAB( 15) "GROW
TH RATE"
140 PRINT : PRINT : PRINT
145 PRINT : PRINT
150 PRINT TAB( 15) "VERSION 2.3"

160 PRINT : PRINT : PRINT
165 PRINT : PRINT
170 PRINT TAB( 5) "COPYRIGHT: IN
STITUT FUER"
175 PRINT TAB( 16) "PHARMAZEUTIS
CHE BIOLOGIE"
178 PRINT TAB( 16) "KARLSTR. 29"

179 PRINT TAB( 16) "8000 MUENCHE
N 2"
180 PRINT : PRINT : PRINT
189 PRINT TAB( 5);
190 INVERSE
191 PRINT "RETURN";
192 NORMAL
193 PRINT "-TASTE DRUECKEN FUER
START"
194 INPUT " "; A$
200 REM FUNKTIONENSCHIRM
210 HOME
220 PRINT : PRINT
230 PRINT "BITTE WAEHLLEN SIE DUR
CH EINTIPPEN"
240 PRINT
250 PRINT "DER NUMMER UND ANSCHL
IESSENDEM"
252 PRINT
255 PRINT "DRUECKEN DER ";
256 INVERSE
257 PRINT "RETURN";
258 NORMAL
259 PRINT "-TASTE DIE"
260 PRINT
270 PRINT "GEWUENSCHTE FUNKTION"

280 PRINT : PRINT : PRINT
290 PRINT (1); TAB( 10); "WEIT
ERFUEHRUNG EINER KINETIK"
295 PRINT
300 PRINT (2); TAB( 10); "NEUA
NLAGE EINER KINETIK"
301 PRINT
302 PRINT (3); TAB( 10) "AUSWE
RTUNG EINER KINETIK"
303 PRINT
305 PRINT : PRINT
310 PRINT (9); TAB( 10); "ABBR
UCH DER VERARBEITUNG"
320 PRINT : PRINT : PRINT
330 INPUT "IHRE WAHL BITTE "; A
350 IF A = 1 THEN GOTO 700
360 IF A = 2 THEN GOTO 400
365 IF A = 3 THEN GOTO 1200
370 IF A = 9 THEN GOTO 2000
380 PRINT "UNZULAESSIGE ANTWORT
- NEUEINGABE"
390 GOTO 330
400 REM NEUANLAGE KINETIK
401 CLEAR
402 HOME
404 PRINT : PRINT
409 INVERSE
410 PRINT TAB( 10) "NEUANLAGE EI
NER KINETIK";

412 PRINT TAB( 40)
414 NORMAL
415 PRINT : PRINT
416 PRINT : PRINT
420 INPUT "BITTE KINETIKNAMEN EI
NGEBEN: "; NAMES
IF NAMES = "" THEN GOTO 200

422 PRINT : PRINT
432 PRINT "WIEVIELE KOLBEN (OHNE
REFERENZKOLBEN)"
434 PRINT
435 INPUT "UMFASST DIE KINETIK
"; Z
436 PRINT : PRINT
438 PRINT "WIEVIELE MESSPUNKTE S
IND: "; PRINT
439 PRINT "MAXIMAL GEPLANT"; TAB(
28); " "; SMAX: PRINT : PRINT
440 INPUT " "; SMAX: PRINT : PRINT
442 INPUT "DAS HEUTIGE DATUM BIT
TE "; C$
460 IF Z < 1 THEN GOSUB 1940: GOTO
432
470 IF SMAX < 2 THEN GOSUB 1940
: GOTO 437
480 HOME
483 PRINT : PRINT : PRINT
485 PRINT "EIN KINETIKFILE MIT N
AMEN"; " ";
486 PRINT " ";
487 INVERSE : PRINT NAMES: NORMAL

488 PRINT
489 PRINT "WURDE ANGELEGT"
490 PRINT : PRINT : PRINT
491 PRINT "ER UMFASST "; Z; " KOLB
EN JE "; SMAX; " MESSPUNKTE"
492 PRINT : PRINT
493 PRINT "DER REFERENZKOLBEN HA
T DIE NUMMER"; TAB( 34); " ";
0
494 PRINT : PRINT
495 PRINT "DIE RESTLICHEN KOLBEN
DIE NUMMERN: 1-"; Z
496 PRINT : PRINT
497 PRINT "DER HEUTIGE TAG HAT D
IE NUMMER"; TAB( 34); " "; 0
498 PRINT : PRINT : PRINT : PRINT
499 INPUT "SIND DIE DATEN KORREK
T? (Y/N)"; A$
500 IF A$ = "Y" THEN GOTO 520
510 IF A$ = "N" THEN GOTO 514
511 PRINT "UNZULAESSIGE EINGABE
- NEUEINGABE"
512 GOTO 499
514 HOME
515 PRINT "DER EINGERICHTETE FIL
E WURDE ZERSTOERT"
519 GOTO 220
520 REM DATEN EINLESEN NACH ANI
MPFEN
522 HOME
530 PRINT "EINLESEN DER DATEN FU
ER TAG ";
535 INVERSE : PRINT "0": NORMAL

540 PRINT : PRINT
541 DIM TK(Z): TKA = 9
542 PRINT : PRINT
543 PRINT "EINGABE IN GRAMM BITT
E"
544 PRINT : PRINT
545 PRINT "BRUTTOGEW. D. REFEREN
ZKOLBENS"; TAB( 30);
546 INPUT " "; TK(0)
550 PRINT : PRINT

```

```

555 FOR I = 1 TO Z
560 PRINT "BRUTTOGEW. D. KOLBENS
    NR. ";
565 INVERSE : PRINT I;: NORMAL
570 PRINT "TAB( 30);
575 INPUT " :";TK(I)
577 PRINT
580 NEXT I
590 REM KONTROLLAUSGABE
591 HOME
592 INVERSE : PRINT TAB( 10)"KO
    NTROLLAUSGABE"; TAB( 40): NORMAL

593 PRINT : PRINT : PRINT
594 FOR I = 0 TO Z
596 PRINT "KOLBEN NR. ";I; TAB(
    20)TK(I); "GRAMM ";
597 PRINT
598 NEXT I
599 PRINT : PRINT
600 INPUT "SIND DIE DATEN KORREK
    T? (Y/N)";AS
602 IF AS = "Y" THEN GOTO 650
604 IF AS = "N" THEN GOTO 609
606 PRINT "UNZULAESSIGE ANTWORT
    - NEUEINGABE"
608 GOTO 600
609 PRINT
610 PRINT "WELCHES KOLBENGEWICHT
    IST FALSCH"
612 PRINT
615 INPUT "BITTE KOLBENNUMMER EI
    NGEBEN ";N
616 IF N > Z THEN PRINT "UNZULA
    ESSIG": GOTO 609
617 IF N < 0 THEN PRINT "UNZULA
    ESSIG": GOTO 609
618 PRINT : PRINT
620 PRINT "SIE KOENNEN DIESE EIN
    GABE JETZT"
621 PRINT
622 PRINT "KORRIGIEREN"
623 PRINT
625 PRINT "BITTE BRUTTOGEW. KOLB
    EN NR. ";
630 INVERSE : PRINT N;: NORMAL
635 INPUT " :";TK(N)
640 GOTO 590
650 REM MESSWERTE ABSPEICHERN
652 DS = CHR$( 4)
654 TL = 0:S = {
655 DL$ = DI$
656 PRINT DS;"NOMON C,I,O"
657 PRINT DS;"OPEN",NAME$
658 PRINT DS;"WRITE",NAME$
660 PRINT NAME$
661 PRINT DI$: PRINT DL$
662 PRINT Z: PRINT SMAX
663 PRINT TL: PRINT S
664 PRINT TL
665 FOR I = 0 TO Z
670 PRINT TK(I)
672 NEXT
675 FOR I = 0 TO 2 * Z
680 PRINT 0
685 NEXT
688 PRINT DS;"CLOSE",NAME$
690 PRINT "DATEN WURDEN ABGESPEI
    CHERT"
692 INPUT "BITTE RETURN DRUECKEN
    ";AS
698 GOTO 200
699 REM
700 REM KINETIK WEITERFUEHREN
701 REM
705 HOME
706 CLEAR
708 PRINT : PRINT : INVERSE
710 PRINT TAB( 5)"WEITERFUEHREN
    EINER KINETIK";
712 PRINT TAB( 40);: NORMAL
715 PRINT : PRINT : PRINT : PRINT

720 INPUT "BITTE KINETIKNAMEN EI
    NGEBEN :";NAME$
721 IF NAME$ = "" THEN GOTO 200
722 PRINT : PRINT
724 PRINT "DIE KINETIK ";
725 INVERSE : PRINT NAME$;: NORMAL
726 PRINT " SOLL WEITERGEFUEHRT"
727 PRINT "WERDEN": PRINT
728 INPUT "IST DER NAME KORREKT?
    (Y/N)";AS
730 IF AS = "Y" THEN GOTO 738
732 IF AS = "N" THEN GOTO 700
734 PRINT "UNZULAESSIGE ANTWORT
    - NEUEINGABE"
736 GOTO 728
738 DS = CHR$( 4)
739 PRINT DS;"NOMON C,I,O"
740 PRINT DS;"OPEN",NAME$
742 PRINT DS;"READ",NAME$
743 INPUT KNAME$: INPUT DI$: INPUT
    DL$
744 INPUT Z: INPUT SMAX: INPUT T
    L: INPUT S
745 PRINT DS;"CLOSE",NAME$
750 HOME
752 PRINT "FILE ";NAME$;" EROEFF
    NET"
753 IF KNAME$ < > NAME$ THEN GOSUB
    1900
754 PRINT : PRINT : PRINT
760 PRINT "BITTE DAS HEUTIGE DAT
    UM"; TAB( 28)";";
761 INPUT " :";DA$
762 PRINT : PRINT
764 PRINT "BITTE HEUTIGE TAGESNU
    MMER"; TAB( 28)";";
765 INPUT " :";TA
766 HOME : PRINT : PRINT
767 INVERSE
768 PRINT TAB( 10)"KONTROLLAUSG
    ABE"; TAB( 40)
769 NORMAL
770 PRINT : PRINT
772 PRINT : PRINT
775 PRINT "AKTUELLES DATUM"; TAB(
    30)";";DA$
776 PRINT
777 PRINT "ZUGEOERIGE TAGESNUMM
    ER"; TAB( 30)";";TA
778 PRINT : PRINT : PRINT
780 INPUT "SIND DIE DATEN KORREK
    T?(Y/N)";AS
782 IF AS = "Y" THEN GOTO 790
784 IF AS = "N" THEN GOTO 750
786 PRINT "UNZULAESSIGE ANTWORT
    - NEUEINGABE"
788 GOTO 780
790 HOME
791 GOSUB 1950
792 PRINT "DATENEINGABE FUER TAG
    ";TA
793 PRINT
794 PRINT "DER KINETIK ";NAME$
796 PRINT : PRINT : PRINT
798 PRINT "EINGABEN IN GRAMM"
799 PRINT : PRINT
800 PRINT "BRUTTOGEW. D. REFEREN
    ZKOLBENS"; TAB( 30);
802 INPUT " :";TK(0)
808 PRINT : PRINT
810 FOR I = 1 TO Z
812 PRINT "BRUTTOGEW. D. KOLBENS
    NR. ";
814 INVERSE : PRINT I;: NORMAL :
    PRINT TAB( 30);
816 INPUT " :";TK(I)
818 PRINT
820 NEXT
830 HOME

```

```

831 INVERSE : PRINT TAB( 10);
832 PRINT "KONTROLLAUSGABE"; TAB(
833 40)
834 NORMAL
835 PRINT : PRINT : PRINT : PRINT
836 PRINT TK(0); TAB( 35)"GRAMM"
837 PRINT : PRINT
838 FOR I = 1 TO Z
840 PRINT I; TAB( 10)"KOLBEN NR.
841 "; I; TAB( 25); " ";
843 PRINT TK(I); TAB( 35)"GRAMM"
844 PRINT
845 NEXT
847 PRINT : PRINT : PRINT
850 INPUT "SIND DIE DATEN KORREK
851 T(Y/N)"; A$
855 IF A$ = "Y" THEN GOTO 900
856 IF A$ = "N" THEN GOTO 869
857 PRINT "UNZULAESSIGE ANTWORT
858 - NEUEINGABE"
859 GOTO 850
860 PRINT
861 PRINT "WELCHE DATE IST FALSC
862 H";
863 PRINT
864 INPUT "BITTE GEBEN SIE DIE N
865 R EIN:"; A
866 PRINT
867 IF A > Z THEN GOSUB 1940: GOTO
868 870
869 IF A < 0 THEN GOSUB 1940: GOTO
870 870
871 PRINT
872 PRINT "SIE HABEN JETZT DIE G
873 ELEGENHEIT DIESE"
874 PRINT "DATE ZU KORRIGIEREN"
875 PRINT "KOLBENGEWICHT NR."; A;
876
877 INPUT " "; TK(A)
878 GOTO 830
879 REM REM EINLESEN DES DATENF
880 ILES
881 DIM T(SMAX)
882 DIM K(SMAX,Z)
883 DIM L(SMAX,Z)
884 DIM M(SMAX,Z)
885 PRINT DS;"OPEN",NAMES
886 PRINT DS;"READ",NAMES
887 INPUT KNAMES: INPUT DIS: INPUT
888 DL$
889 INPUT Z,SMAX,TL,S
890 FOR I = 0 TO S - 1
891 INPUT T(I)
892 FOR J = 0 TO Z
893 INPUT K(I,J)
894 NEXT J
895 FOR J = 0 TO Z
896 INPUT L(I,J)
897 NEXT J
898 FOR J = 1 TO Z
899 INPUT M(I,J)
900 NEXT J
901 PRINT DS;"CLOSE",NAMES
902 T(S) = TA
903 FOR I = 0 TO Z
904 K(S,I) = TK(I)
905 NEXT I
906 L(S,0) = K(S - 1,0) - K(S,0)
907 FOR I = 1 TO Z
908 L(S,I) = K(S - 1,I) - K(S,I) -
909 L(S,0)
910 NEXT I
911 FOR I = 1 TO Z
912 M(S,I) = M(S - 1,I) + L(S,I)
913
914 NEXT I
915 REM VERAENDERN DES FILELEAD
916 ERS
917 DL$ = DA$
918 TL = TA
919 S = S + 1
920 REM DATENFILE, WEGSPEICHERN
921 PRINT DS;"OPEN",NAMES
922 PRINT DS;"WRITE",NAMES
923 PRINT NAMES
924 PRINT DIS: PRINT DL$
925 PRINT Z: PRINT SMAX
926 PRINT TL: PRINT S
927 FOR I = 0 TO S - 1
928 PRINT T(I)
929 FOR J = 0 TO Z
930 PRINT K(I,J)
931 NEXT J
932 FOR J = 0 TO Z
933 PRINT L(I,J)
934 NEXT J
935 FOR J = 1 TO Z
936 PRINT M(I,J)
937 NEXT J
938 NEXT I
939 PRINT DS;"CLOSE",NAMES
940 PRINT "DATEN WURDEN UEBERTR
941 AGEN"
942 INPUT "BITTE RETURN DRUECKE
943 N"; A$
944 GOTO 200
945 REM AUSWERTEN UND GRAPHIK
946 CLEAR
947 HOME
948 REM ABFRAGEN
949 PRINT
950 INPUT "KINETIKNAME BITTE:
951 "; NAMES
952 IF NAMES = "" THEN GOTO 20
953
954 PRINT : PRINT : PRINT
955 PRINT "DIE KINETIK";
956 INVERSE : PRINT NAMES;: NORMAL
957
958 PRINT " SOLL BEARBEITET WER
959 DEN"
960 PRINT
961 INPUT "IST DER NAME KORREKT
962 ?(Y/N)"; A$
963 IF A$ = "Y" THEN GOTO 1300
964
965 IF A$ = "N" THEN GOTO 1210
966
967 PRINT "UNZULAESSIGE ANTWORT
968 - NEUEINGABE"
969 GOTO 1257
970 REM FILE EINLESEN
971 DS = CHR$( 4)
972 PRINT DS;"OPEN",NAMES
973 PRINT DS;"READ",NAMES
974 INPUT KNAMES: INPUT DIS: INPUT
975 DL$
976 INPUT Z: INPUT SMAX: INPUT
977 TL: INPUT S
978 DIM T(SMAX)
979 DIM K(SMAX,Z)
980 DIM L(SMAX,Z)
981 DIM M(SMAX,Z)
982 FOR I = 0 TO S - 1
983 INPUT T(I)
984 FOR J = 0 TO Z
985 INPUT K(I,J)
986 NEXT J
987 FOR J = 0 TO Z
988 INPUT L(I,J)
989 NEXT J
990 FOR J = 1 TO Z
991 INPUT M(I,J)
992 NEXT J
993 PRINT DS;"CLOSE",NAMES
994

```

```

1552 PRINT "FILE ";NAME$;" EINGE
LESEN"
1555 PRINT : PRINT : PRINT
1561 PRINT "WELCHER KOLBEN DER K
INETIK ";NAME$
1562 PRINT "SOLL DARGESTELLT WER
DEN?"; PRINT
1565 INPUT "KOLBENNUMMER ODER 0
EINGEBEN:";A
1566 IF A = 0 THEN GOTO 200
1568 IF A < 1 THEN GOSUB 1940: GOTO
1562
1570 IF A > Z THEN GOSUB 1940: GOTO
1562
1572 J = A
1580 HOME
1581 PRINT
1582 PRINT "MOECHTEN SIE LISTENA
USGABE ODER GRAPHIK?"
1583 PRINT
1585 INPUT " G = GRAPHIK / L
= LISTE ";A$
1594 IF A$ = "" THEN GOTO 1555
1595 IF A$ = "G" THEN GOTO 1609
1596 IF A$ = "L" THEN GOTO 1599
1597 GOSUB 1940
1598 GOTO 1582
1599 PR# 1: PRINT : PRINT : PRINT
1600 PRINT TAB( 10)"KINETIK
: ";NAME$
1601 PRINT : PRINT TAB( 10)"KOL
BEN NR. ";J
1602 PRINT : PRINT "TAG"; TAB( 5
)"GEWICHT";
1603 PRINT TAB( 19)"DIFF."; TAB(
33)"S(DIFF.)
1604 PRINT
1605 FOR I = 0 TO S - 1
1606 PRINT T(I); TAB( 5)K(I,J);
1607 PRINT TAB( 19)L(I,J); TAB(
33)M(I,J)
1608 NEXT I: PR# 0: GOTO 1561
1609 REM ACHSEN ZEICHNEN
1610 HOME
1611 INPUT "MAXIMALE TAGESZAHL
: ";TMAX
1614 INPUT "MAXIMALE GEWICHTSABN
AHME ";GMAX
1615 INPUT "DRUCKAUSGABE ? (Y/N)
";A$
1616 IF A$ < > "Y" AND A$ < >
"N" THEN GOTO 1615
1618 HGR2
1619 HCOLOR= 7
1620 HPLLOT 10,10 TO 279,10
1630 HPLLOT 10,10 TO 10,159
1640 HPLLOT 278,9 TO 278,11
1650 HPLLOT 277,8 TO 277,12
1660 HPLLOT 9,158 TO 11,158
1670 HPLLOT 8,157 TO 12,157
1680 REM ACHSENFAKTOREN BERECHN
EN
1690 PT = 260 / TMAX
1700 PG = 140 / GMAX
1720 REM SKALEN ZEICHNEN
1730 FOR I = 0 TO TMAX
1735 HPLLOT I * PT + 10,9 TO I *
PT + 10,7
1740 NEXT I
1745 FOR I = 0 TO GMAX
1750 HPLLOT 7,I * PG + 10 TO 9,I *
PG + 10
1755 NEXT I
1800 REM KURVE ZEICHNEN
1820 HPLLOT 10,10
1830 FOR I = 1 TO S - 1
1831 P1 = T(I) * PT + 10
1832 P2 = M(I,J) * PG + 10
1834 IF P1 < 10 THEN P1 = 10
1835 IF P1 > 279 THEN P1 = 279
1836 IF P2 > 10 THEN P2 = 10
1837 IF P2 > 159 THEN P2 = 159
1840 HPLLOT TO P1,P2
1850 NEXT I
1852 INPUT " ";A$
1853 REM !!!!! STEUERZEICHEN FÜ
R HARDCOPY !!!!!
1854 IF A$ = "N" THEN GOTO 1861
1856 PRINT CHR$( 4);"PR#1"
1857 PRINT CHR$( 9);"G2E"
1858 PRINT CHR$( 4);"PR#0"
1861 TEXT : HOME
1865 GOTO 1561
1890 GOTO 2000
1900 REM
1910 PRINT "DER FILE ";NAME$;" E
NTHAELT FALSCHEN BEZEICHNER"
1915 FLASH
1920 PRINT "SICHERHEITSABBRUCH"
1925 NORMAL
1930 GOTO 2010
1935 RETURN
1940 REM EINGABENKONTROLLE
1941 PRINT : INVERSE
1942 PRINT "UNZULAESSIGER WERT -
NEUEINGABE!"
1943 NORMAL
1944 RETURN
1950 REM DIM.VEREINBARUNG TK
1952 IF TKA = 9 THEN RETURN
1954 DIM TK(Z)
1956 TKA = 9
1958 RETURN
2000 HOME
2010 END

```

Ü

2.3 Experimentelle Überprüfung der Methode

Zum Nachweis der Allgemeingültigkeit der Methode wurden verschiedene im Hause geführte Zellkulturen aus unterschiedlichen Pflanzenfamilien angezogen und gezeigt, daß bei allen der typische, durch die Theorie vorausgesagte Gewichtsverlauf zu beobachten ist, wodurch ausgeschlossen wird, daß es sich um ein spezifisches Phänomen eines einzelnen Zellkulturstammes handelt.

Der Einfluß von Animpfdichte, Kulturmedium und Kultivierungstemperatur auf den Verlauf der Gewichtskurve sowie der Zusammenhang zwischen Gewichtsabnahme und Frisch- und Trockengewichtszunahme, wurde mit der Kultur Tina30 untersucht.

Diese Ergebnisse dienen zur Bestimmung des optimalen Erntezeitpunktes dieser Suspensionszellkultur für Gewebe, das zur Isolierung der Strictosidinsynthese verwendet werden sollte.

2.3.1 Allgemeine Anwendbarkeit der Methode

Gezeigt werden sollte, daß unterschiedliche pflanzliche Suspensionskulturen qualitativ gleiche und reproduzierbare Gewichtsverläufe zeigen. Endogene Parameter der Zellkulturen (Frischgewicht, Trockengewicht, Enzymaktivitäten) wurden für diesen Vergleich nicht untersucht.

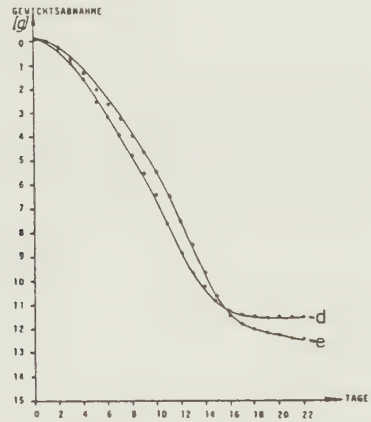
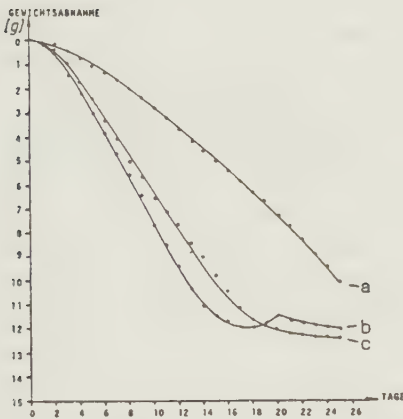
Verwendet wurden folgende fünf Kulturen von Pflanzen aus drei Pflanzenfamilien:

Tina30	<u>R. serpentina</u>	<u>Apocynaceae</u>
RT71	<u>C. roseus</u>	<u>Apocynaceae</u>
B.wilson.	<u>B. wilsoniae</u>	<u>Berberidaceae</u>
B.stolo.V29	<u>B. stolonifera</u>	<u>Berberidaceae</u>
Rosa	<u>R. canina</u>	<u>Rosaceae</u>

Je 3 FBK mit 1 l vorgelegtem LS-Medium wurden mit unterschiedlichen Mengen Zellsuspension (die Gewichtsangaben können den Abbildungen entnommen werden) aus einer einheitlichen Vorkultur beimpft, bei 23°C kultiviert und das Gewicht der Kulturen täglich kontrolliert.

Abbildung 17 zeigt den Gewichtsverlauf je eines ausgewählten Kolbens jeder Kultur.

Man sieht, daß bei allen Kulturen der verschiedenen Stämme, mit Ausnahme von B. wilsoniae, ähnliche Gewichtsverläufe und die gleiche maximale Gewichtsabnahme zu beobachten ist.



a) B. wilson. (B. wilsoniae)
b) Rosa (R. canina)
c) B. stolo. V29 (B. stolonifera)

d) Tina30 (R. serpentina)
e) RT71 (C. roseus)

Abb. 17 Gewichtskurven von Suspensionszellkulturen verschiedener Stämme bei gleichen Kultivierungsbedingungen

Medium : 11 LS-Medium
Kulturgefäß : FBK
Inoculum : je 200 g Zellsusp. (stationäre Phase)

Alle Kulturen zeigen einen ähnlichen Kurvenverlauf und gleiche maximale Gewichtsabnahme von 12g. Bezogen auf die im Medium enthaltenen 30 g Saccharose entspricht das einem Atmungskoeffizienten von 1.

Das langsame Wachstum von B. wilsoniae in diesem Medium resultiert in dem gegenüber den anderen gut wachsenden Kulturen abweichenden Gewichtsverlauf.

B. wilsoniae ist eine, wie schon visuell festgestellt werden kann, schlecht wachsende Kultur, was dem langsamen Abfall entspricht. Sie hatte nach knapp einem Monat noch nicht die stationäre Phase erreicht. Da sehr wahrscheinlich auch die Vorkul-

tur zum Zeitpunkt des Überimpfens noch nicht in der stationären Phase war, mußte man davon ausgehen, daß mit dem Medium des Inoculums eine unbekannte Menge Zucker eingeschleppt wurde, weshalb diese Kultur für die Bestimmung des Atmungsquotienten nicht mehr geeignet war. Die Messungen wurden deshalb gleichzeitig mit den Messungen an den bereits stationären Kulturen abgebrochen.

In Abbildung 18 sind die Gewichtskurven aller Kolben eines Versuchs der Kulturen R. canina und B. stolonifera jeweils nebeneinander dargestellt und die Inoculumgewichte angegeben. Individuelle Unterschiede der einzelnen Kulturen eines Stammes, bedingt durch die unterschiedlichen Animpfdichten, führen zu meßbaren Änderungen des Kurvenverlaufes.

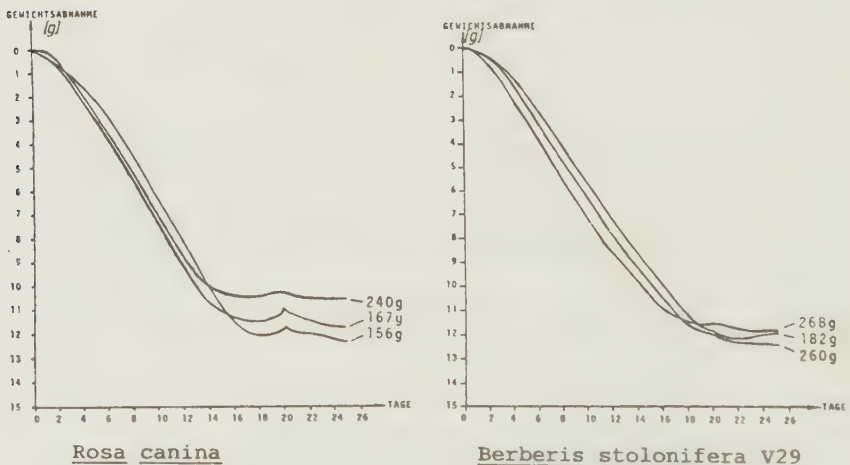


Abb. 18 Vergleich der Gewichtskurven von Kulturen desselben Stammes bei unterschiedlicher Animpfdichte

Das Gewicht des Inoculums (stationäre Vorkultur) ist bei den einzelnen Kurven angegeben.

Inoculum: Frischgew. = 30% d. Suspensionsgew.
Trockengew. = 1.5% d. Suspensionsgew.

Höhere Animpfdichte resultiert in schnellerem Zucker-
verbrauch und früherem Erreichen der stationären
Phase

Vergleichskolben einer Kultur zeigen die hohe Reproduzierbarkeit der Gewichtskurven, was eine wesentliche Voraussetzung ist, um die Gewichtsabnahme zur Bezugsgröße für die Gewebeproduktion machen zu können.

Höhere Animpfdichten verschieben die Gewichtskurve nach links, niedrigere nach rechts. Hohe Animpfdichten führen scheinbar zu geringfügig niedrigeren Gesamtgewichtsabnahmen. Wesentlich für die Fermentation ist jedoch der nicht stationäre Bereich und hier äußert sich die Animpfdichte nur in einem Zeitversatz der Kurve.

Nach Erreichen der stationären Phase zeigt sich kein vollkommen ebener Kurvenverlauf bei den Kulturen. Zum einen müssen die Zellen auf andere Energiequellen umsteigen, zum anderen entstehen kleine Fehler durch Differenzen der Wasserverdunstung zwischen Meß- und Referenzkolben. Die Wasserverdunstung hängt auch von der Qualität des Schaumstoffstopfens des Verschlusses ab. Es können geringe Differenzen im Diffusionswiderstand bestehen und sich über die Meßzeit zu einem Fehler kummulieren, der einige Zehntel Gramm beträgt.

Die erzielte Genauigkeit ist für alle enzymatischen Untersuchungen mehr als ausreichend. 0.1 g entspricht weniger als 1 % der Gesamtgewichtsabnahme. Der relative Fehler über die gesamte Meßdauer liegt also bei 2 - 3 % vom Meßwert. Da es sich um kumulative Fehler handelt sind frühe Meßwerte genauer.

2.3.2 Einfluß der Fermentationsbedingungen

Mit der Kultur Tina30 wurde untersucht, wie sich eine Variation der Animpfdichte, der Temperatur und des Mediumtyps auf die Gewichtskurve auswirkt. Eine sensitive Meßmethode muß diese Einflüsse erfassen können.

In Abbildung 19 sind die Gewichtskurven von Fernbachkolben mit verschiedener Animpfdichte bei unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen dargestellt. In Übereinstimmung mit der Theorie findet man, daß höhere Animpfdichte und höhere Kultivierungstemperatur zu schnellerer Gewichtsabnahme führen.

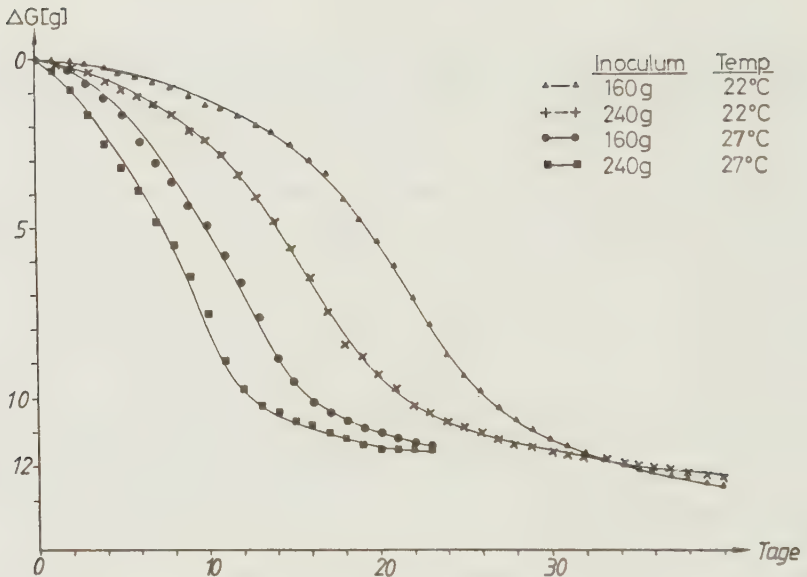


Abb. 19 Einfluß von Animpfdichte und Kultivierungstemperatur auf die Gewichtskurve von Tina30 (*R. serpentina*)

Inoculum - Frischgewicht = 30 % d. Inoculumgewichts
 - Trockengewicht = 1.5 % d. Inoculumgewichts
 Medium : 1 l LS-Medium

Bei unterschiedlicher Animpfdichte und gleicher Temperatur erreicht der Kolben mit dem höheren Inoculum früher die stationäre Phase.
 Bei gleicher Animpfdichte und unterschiedlicher Temperatur erreicht der Kolben, der bei höherer Temperatur kultiviert wird, früher die stationäre Phase.

Kurvenform und maximale Gewichtsabnahme bleiben gleich.

Die Variation der Medien, insbesondere der Hormonspiegel und -gleichgewichte, beeinflusst die Stoffwechselleistungen der Suspensionskulturen.

Ri-Medium bezeichnet man wegen der stimulierten Alkaloidsynthese als "Produktionsmedium" für die *Apocynaceae*-Kulturen.

Aus einer in LS-Medium angezogenen Vorkultur wurden Fernbachkolben mit LS-Medium und mit Ri-Medium angeimpft. Wie aus dem in Abbildung 20 dargestellten Gewichtsverlauf zu erkennen ist, wächst die Kultur in Ri-Medium deutlich langsamer als in LS-Medium, was mit den visuellen Beobachtungen übereinstimmt.

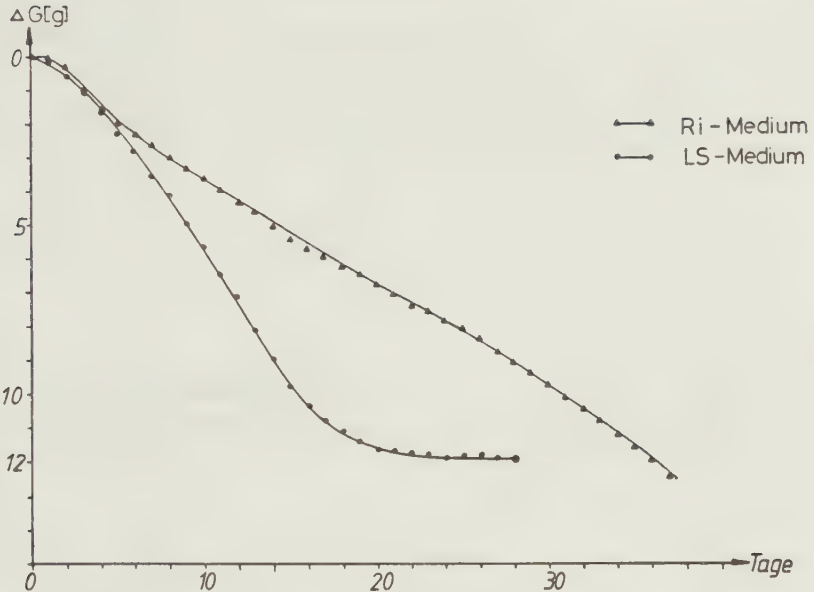


Abb. 20 Einfluß des Mediums auf die Gewichtskurve der Kultur Tina30 (R. serpentina)

FBK mit 11 LS-Medium bzw. Ri-Medium zeigen nach Animpfen mit je 200 g Zellsuspension aus einer stationären Vorkultur (LS-Medium) unterschiedliche Gewichtskurven. Das langsamere Wachstum der Kultur in Ri-Medium kommt in dem flachen Verlauf der Kurve zum Ausdruck.

Es spricht für die Sensitivität der Methode, daß alle Änderungen der Kultivierungsbedingungen wie Temperatur, Animpfdichte und Medium, deutlich meßbare Auswirkungen auf den Gewichtsverlauf der Kulturkolben haben.

Diese Technik ist also zur Optimierung der Gewebeproduktion und zu deren Überwachung geeignet.

2.3.3 Gewebeoptimierung unter Produktionsbedingungen

Für die Kultur Tina30 wurde eine Kinetik bei 27°C in Fernbachkolben durchgeführt, um den optimalen Erntezeitpunkt für Gewebe zur Isolierung der Strictosidinsynthese zu ermitteln.

Bestimmt wurden Trockengewicht und Protein sowie die Aktivitäten der Strictosidinsynthese und -glukosidase der entnommenen Gewebeproben. Beim Protein ist nur der Anteil der löslichen

Proteine erfaßt, da sowohl Strictosidinsynthese als auch Strictosidinglukosidase in dieser Fraktion zu finden sind.

Die Ergebnisse, jeweils auf einen Liter Medium bezogen, sind in den Abbildungen 21 und 22 wiedergegeben.

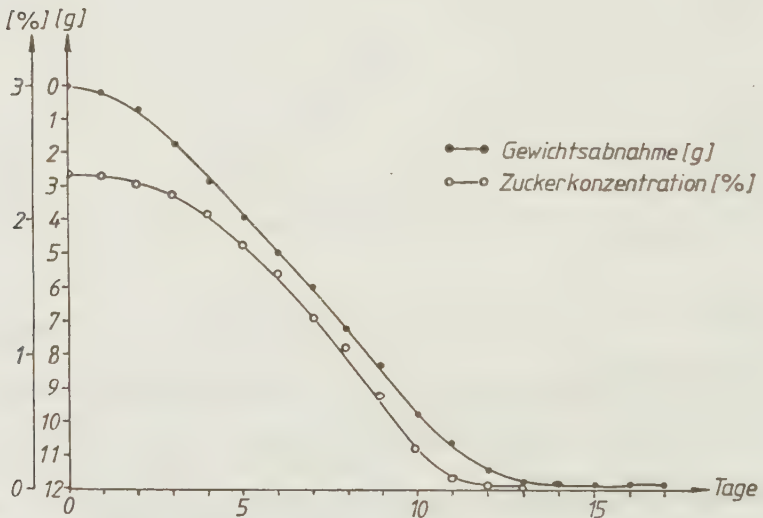


Abb. 21 Korrelation zwischen Gewichtsabnahme der Kultur Tina30 (*R. serpentina*) und der Zuckerkonzentration des LS-Mediums

Gewichtsabnahme der Kultur und Abnahme der Zuckerkonzentration sind direkt korreliert

LS-Medium wird mit einer Saccharosekonzentration von 3 % hergestellt. Durch das Beimpfen mit Zellsuspension der Vorkultur tritt eine Verdünnung ein. Das erklärt den scheinbar zu niedrigen Start der Zuckerkurve.

Bei einer konventionellen Kinetik wird mit Gewebekuchen angeimpft, bei der Produktion jedoch mit Suspension. Der Verdünnungseffekt und die daraus resultierenden Abweichungen bleiben außer Betracht.

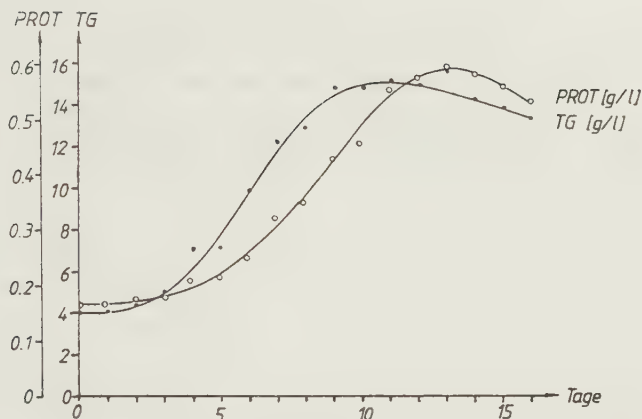


Abb. 22a Protein und Trockengewicht pro Liter Medium der Kultur Tina30 (R. serpentina) in LS-Medium

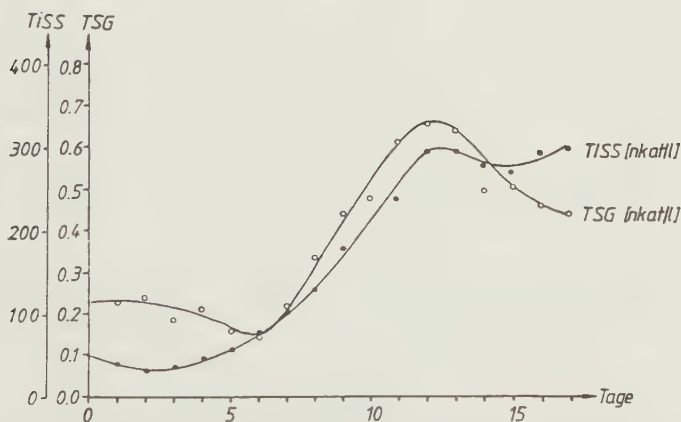


Abb. 22b Aktivitätsverlauf von Strictosidinsynthese (TiSS) und Strictosidinglukosidase (TSG) in der Kultur Tina30 (R. serpentina) in LS-Medium

Durch das Inoculum bedingt sind die Anfangswerte der Protein-, Trockengewichts- und Enzymaktivitätsgehalte nicht gleich null. Aus der Saccharose des frischen Mediums wird jedoch nur die Zunahme dieser Größen getragen.

Aus Abbildung 21 ist zu ersehen, daß ab dem 15. Tag kein Zucker mehr nachweisbar ist. Nur bis zu diesem Zeitpunkt ist Saccharose die dominierende Energiequelle, danach müssen andere Substrate an diese Stelle treten, z.B. Proteine.

Für den Zeitraum bis zum vollständigen Verbrauch des Zuckers sind in Abbildung 23 die Gewichtsabnahme des Kulturgefäßes und die Zunahmen des Trockengewichts, Proteingehaltes und der Strictosidinsyntheseaktivität zusammen dargestellt.

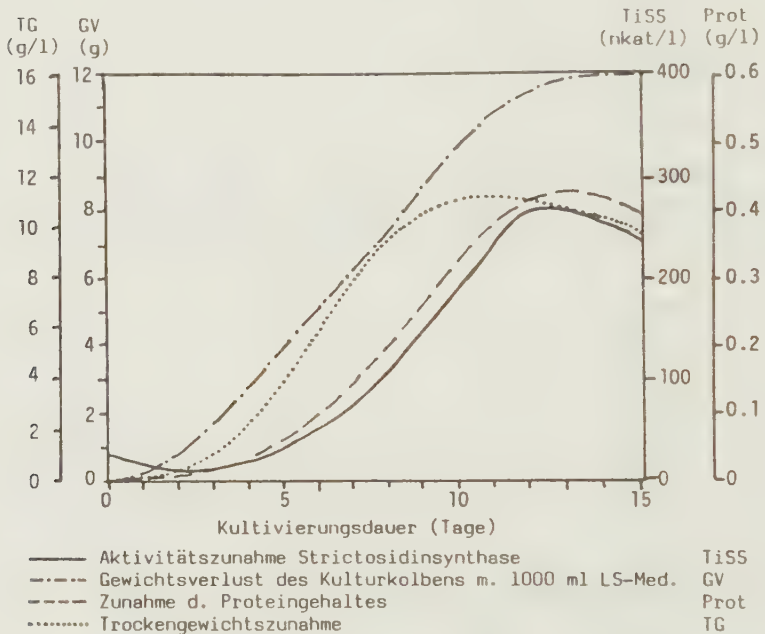


Abb. 23 Korrelation zwischen dem Gewichtsverlust des Kulturgefäßes, der Trockengewichtszunahme, der Zunahme des Proteingehaltes und dem Gehalt an Strictosidinsyntheseaktivität

Auswertung

Die Gewichtsabnahme des Kulturgefäßes ist direkt korreliert mit der Abnahme des Zuckers im Medium (vgl. Abb. 21).

Die Zunahme der Strictosidinsyntheseaktivität und des Proteins sind unmittelbar mit der Gewichtsabnahme verknüpft.

Der zeitliche Versatz des Trockengewichtsverlaufes ist dadurch bedingt, daß nach der Aufnahme des Zuckers in die Zellen, was bereits eine Trockengewichtserhöhung bedeutet, bis zum Auftre-

ten der mit der Energie aus diesem Zucker synthetisierten Proteine ein gewisser Zeitraum vergeht; hier etwa zwei Tage.

Damit ist gezeigt, daß der Gewichtsverlauf des Kolbens eine relevante Meßgröße für die aktuellen Parameter der enthaltenen Kultur ist.

Die Gewichtskurve ist, mit umgekehrtem Vorzeichen, gleichbedeutend mit der Wachstumskurve der Kultur.

Ergebnis

Damit ist bewiesen, daß die leicht zugängliche Meßgröße des Gewichtsverlaufes des Kulturgefäßes die zerstörungsfreie Bestimmung des Wachstumszustandes einer Kultur ermöglicht.

Wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt wurde, werden mit anderen Zellkulturen ähnliche Gewichtsverläufe festgestellt. Nichts widerspricht der Annahme, daß auch bei ihnen die endogenen Zustände ebenso direkt von der Saccharosekonzentration bzw. Gewichtsabnahme des Kulturgefäßes abhängen, wie bei der untersuchten Kultur Tina30 (R. serpentina).

Diese Kinetikmethode ist also universell für Suspensionszellkulturen einsetzbar.

Anwendung

Der optimale Zeitpunkt für die Ernte der Kultur Tina30 zur Isolierung der Enzyme Strictosidinsynthase und Strictosidinglukosidase ist nach zwölf Tagen erreicht und fällt zusammen mit dem vollständigen Verbrauch des Zuckervorrates und dem Erreichen der maximalen Gewichtsabnahme.

Für die Gewebeanzucht bedeutet das, daß eine Kultur, unabhängig von ihrer Animpfdichte, dann ihren optimalen Erntezeitpunkt erreicht hat, wenn die Gewichtsabnahme aufhört.

Bei der Gewebeproduktion wird jeder Kolben unmittelbar nach dem Beimpfen und ab dem 8. Tag täglich gewogen.

Bei Erreichen einer Nettogewichtsdifferenz von 12g pro Liter Vorlage LS-Medium knickt die Gewichtskurve ab und der Erntezeitpunkt ist erreicht.

3. Ermittlung der Basisdaten für die Anreicherung der Strictosidinsynthese und ihrer Folgeenzyme

Für die Planung eines Anreicherungsverfahrens für ein Enzym ist es notwendig, mit der Ermittlung einiger elementarer Informationen über das Probenmaterial, das zu reinigende Enzym und seine Nachfolgeenzyme in der jeweiligen Biosynthesekette zu beginnen.

Dabei spielen das Molekulargewicht und der Isoelektrische Punkt, zwei unveränderliche Charakteristika des gesuchten Proteins, die zentrale Rolle. Diese wesentlichen Daten lassen sich durch Gelpermeations- und Ionenaustauschchromatographie bzw. Isoelektrofokussierung innerhalb kurzer Zeit ermitteln.

Das folgende allgemeine Arbeitsschema dafür hat sich als zeitsparend und effektiv herauskristallisiert.

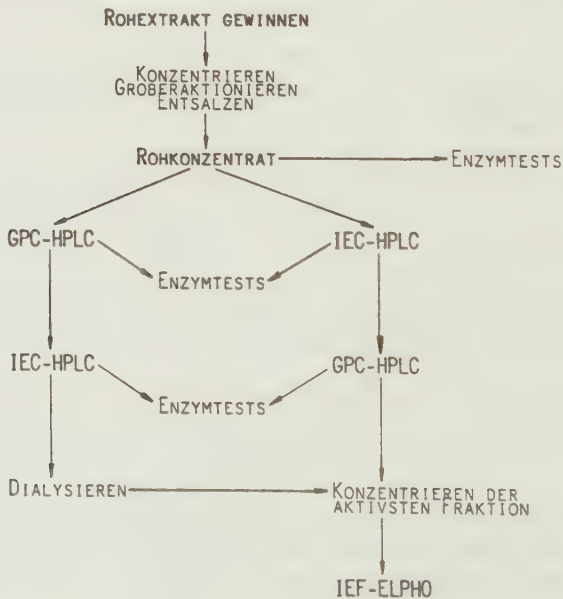


Abb. 24 Analysenplan zur Beurteilung des Probenmaterials für die Enzymisolierung

Bei der Untersuchung von Rauwolfia serpentina Gewebe wurden die Enzyme Strictosidinsynthase, Strictosidinglukosidase und unspezifische β -Glukosidasen betrachtet.

3.1 Gewinnung der löslichen Proteinfraktion

Relativ kleine Gewebemengen, d.h. einige Gramm, sind theoretisch ausreichend für eine vollständige Analyse. Da jedoch in einigen Schritten Verluste in Kauf genommen werden, sind 50g Frischgewicht Zellmaterial angemessen. Dabei wird davon ausgegangen, daß der Trockengewichtsanteil größer als 5 %, und der Proteinanteil größer als 0.2 % ist.

Ein wesentlicher Punkt für rasches Arbeiten ist die Verwendung eines einheitlichen Puffersystems für die Rohextraktbereitung und die HPLC-Chromatographieschritte.

Der verwendete 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6.5 war für alle untersuchten Enzyme geeignet und mit den Säulenmaterialien verträglich.

Rohextraktbereitung

50 g schockgefrorenes Gewebe mit 100 ml 20 mM Kaliumphosphat Puffer pH 6.5 im Eisbad rühren, bis eine homogene Suspension entstanden ist. Die unlöslichen Bestandteile abzentrifugieren (10000 g, 10 min, 4°C (1)) und den Überstand vorsichtig dekantieren.

Zum einen hängt die Trennleistung, insbesondere bei der GPC, vom Probenvolumen ab (KATO et.al. (1980 a u. b)), zum anderen wird die Probe bei der Chromatographie verdünnt. Um in den Eluatzen die Aktivitätstests dennoch direkt durchführen zu können, muß die Proteinlösung auf etwa 10 mg/ml konzentriert werden.

Wie aus Vorversuchen bekannt war, ist die Strictosidinsynthaseaktivität mit 50 % Ammoniumsulfat vollständig ausfällbar.

(1) z.B. Sorvall GSA-Rotor, 9000 Upm

Konzentrieren und Entsalzen

0 - 50 % Ammoniumsulfatfällung im Eisbad durchführen, das präzipitierte Protein pelletieren (10000 g, 10 min, 4°C), in 5 ml kaltem Aufschlußpuffer aufnehmen und dialysieren.

Die Dialyse dient zum Abtrennen verschleppten Ammoniumsulfats, das bei den Aktivitätstests und der Ionenaustauschchromatographie stört.

Da es sich nur um kleine Probenmengen handelte, die rasch entsalzt werden sollten, wurde eine forcierte Dialyse durchgeführt.

Forcierte Dialyse

250 ml gekühlten Aufschlußpuffer in einem Erlenmeyerkolben mit 20 g Mischbettaustauscher (1) versetzen. Die Probe wird in einen Dialyseschlauch überführt und 2h bei 4°C, unter langsamem Rühren, dialysiert.

Danach entnimmt man den Dialyseschlauch, spült ihn kurz mit destilliertem Wasser ab, sticht ihn mit einer Injektionsnadel am tiefsten Punkt an und läßt das Dialysat in ein Zentrifugenglas laufen, in dem 100 µl 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5 vorgelegt sind.

Längere Dialysezeiten führen eventuell zu Proteinausfällungen im Dialyseschlauch, da das Wasser durch den Mischbettaustauscher vollständig entsalzt wird. Die Dialyse ist dennoch mit Puffer und nicht mit Wasser anzusetzen, um den Anfangs-pH-Wert richtig einzustellen. Einmal stabilisiert, wird er durch den Austauscher nicht mehr verändert. Bei Verwendung von Wasser kann es zu pH-Schwankungen kommen.

Zur Schonung der HPLC-Säulen ist unbedingt auf Schwebstofffreiheit zu achten, was man durch Membranfiltration erreicht.

(1) SERVA, Amberlite MB1 p.A.

(2) SERVA, Servapor, Trenngrenze MW = 10000

Feinstfiltration

Erneut abzentrifugieren (Bedingungen wie oben), den Überstand in eine 5ml-Injektionsspritze aufziehen und einer Feinstfiltration mit Filtermembranen von 0.8 µm Porenweite unterziehen (1).

Um abschätzen zu können, ob die Enzymaktivitäten auch nach mehreren Chromatographieschritten in den Eluaten noch nachweisbar sind, werden alle Enzymtests mit Verdünnungsreihen des Rohkonzentrates durchgeführt.

Enzymtests

Alle geplanten Enzymtests mit Verdünnungen 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80 des Rohkonzentrates durchführen. Dabei wird von jeder Verdünnung einmal 100 % und einmal 50 % des maximalen Probenvolumens des jeweiligen Tests eingesetzt.

Die Enzyme Strictosidinsynthase und unspezifische Glukosidasen waren bei Verdünnungen 1:40 noch sicher nachzuweisen. Die spezifische Strictosidinglukosidase konnte nur bis zu einer Verdünnung von 1:20 noch detektiert werden.

Die Probenverdünnung während der Chromatographieschritte liegt bei etwa 1:10 bis 1:20. Das Rohkonzentrat wies also für alle untersuchten Enzyme ausreichende Aktivität auf.

3.2 HPLC-Trennungen

Da zwei HPLC-Anlagen zur Verfügung standen, konnten die IEC- und GPC-Trennungen parallel durchgeführt werden. Die verwendeten Gerätesysteme sind auf den Seiten 32 ff beschrieben.

Die Trennzeiten sind etwa gleich lang; so konnten die fraktionierten Eluate in einem Arbeitsgang getestet werden.

Die Eluate wurden mit einer Auflösung von 2.5 % fraktioniert, d.h. das Gesamtelat in 40 Fraktionen aufgefangen.

(1) Dazu können auch unsterile Filterhalter und Membranen benutzt werden.

GPC-HPLC

Probe	: Rohkonzentrat
Probenvolumen	: 2 ml
Laufmittel	: 20 mM Kaliumphosphat pH 6.5 10 mM Natriumchlorid
Flußrate	: 3 ml/min

Das Laufmittel enthält 10 mM Natriumchlorid, um Ionenaustauschereffekte des Säulenmaterials zu maskieren. Ohne den Zusatz starker Ionen kommt es zu deutlicher Peakverbreiterung.

IEC-HPLC

Probe	: Rohkonzentrat
Probenvolumen	: 2 ml
Laufmittel	: Komp. A : 20 mM Kaliumphosphat pH 6.5 Komp. B : 20 mM Kaliumphosphat pH 6.5 1 M Natriumchlorid
Flußrate	: 1 ml / min
Gradient	: 0 - 100 % Komp. B in 90 min

Nach dem Auflösen des Natriumchlorids im Aufschlußpuffer muß der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls nachgestellt werden.

Der Test auf die Strictosidin-spezifische Glukosidase ist auch in den Fraktionen positiv, die unspezifische β -Glukosidasen enthalten.

Für Fraktionen, in denen der Test auf unspezifische Glukosidasen positiv war, sind der Übersichtlichkeit halber die Ergebnisse des Tests auf Strictosidinglukosidase nicht eingezeichnet.

In Abb. 25 und 26 sind die HPLC-Chromatogramme wiedergegeben. Die eingezeichneten Enzymaktivitäten stellen den qualitativen Verlauf dar, wie er aus den Tests ermittelt wurde. Eine Umrechnung auf absolute Aktivitätswerte fand nicht statt.

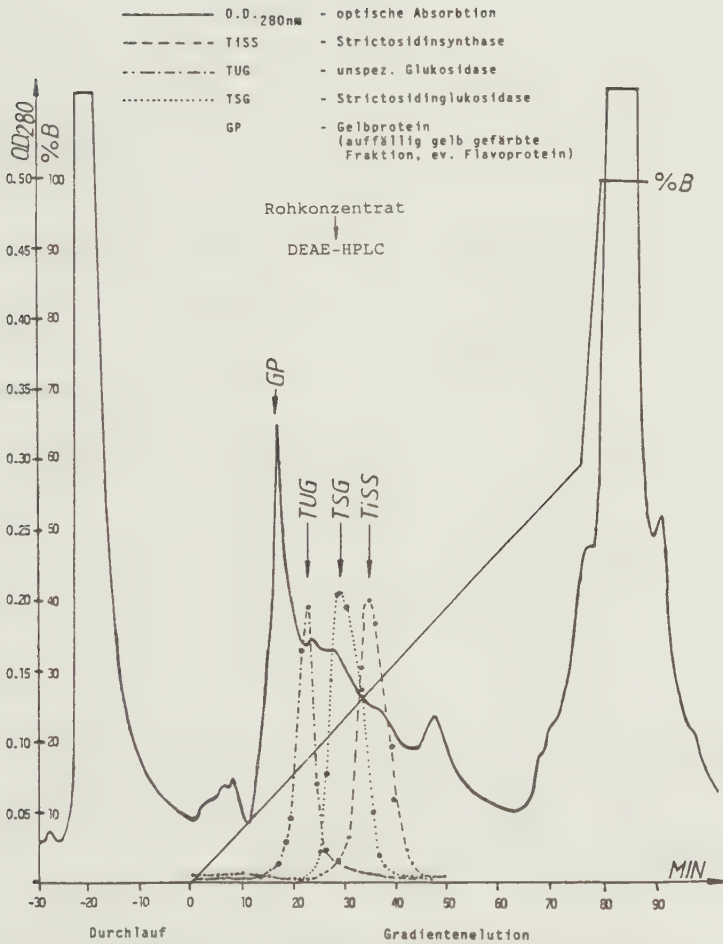


Abb. 25 IEC-Chromatogramm des ersten Trennungsschrittes mit eingezeichneten Enzymaktivitäten

Fluß : 1 ml/min Beladung : 22 mg Protein
 Vol. : 2 ml Säule : DEAE=SP500 (10 x 250 mm)
 Laufmittel : A) 20 mM Kaliumphosphat pH 6.5
 B) Komp A + 1 M Natriumchlorid

Mit Ionenaustauschchromatographie kann die unspezifische Glukosidase vollständig von der Strictosidinsynthese separiert werden. Strictosidinglukosidase- und Strictosidinsyntheseaktivität überlappen sich deutlich.

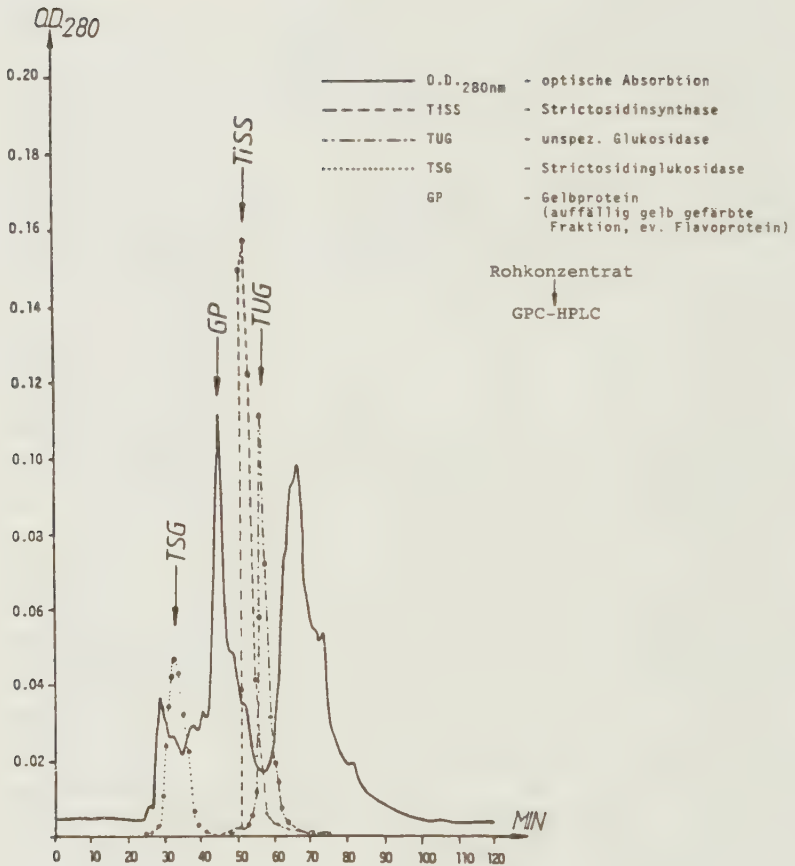


Abb. 26 GPC-Chromatogramm des ersten Trennungsschrittes mit eingezeichneten Enzymaktivitäten

Säule : TSK G3000SW (21.5 x 600 mm)
Fluß : 3 ml/min
Beladung : 22 mg Protein Vol. : 2 ml
Elutionsm.: 20 mM Kaliumphosphat pH 6.5
10 mM Natriumchlorid

In der Gelpermeationschromatographie ist die Strictosidin-spezifische Glukosidase zuverlässig von Strictosidinsynthese und unspezifischer Glukosidase abzutrennen. Strictosidinsynthese und unspezifische Glukosidase sind jedoch nur unzureichend aufzulösen. Die beiden Aktivitätspeaks liegen so nah, daß bei

hoher Säulenbeladung durch die resultierende Peakverbreiterung keine echte Trennung mehr möglich ist.

Die Ergebnisse der IEC- und GPC-Analyse für die beiden Strictosidin-spezifischen Enzyme sind in einem Trennschema zusammengestellt.

Strictosidinsynthese

	TSG	TUG
GPC	+	-
IEC	-	+

Strictosidinglukosidase

	TiSS	TUG
GPC	+	+
IEC	-	-

TiSS : Strictosidinsynthese

+ : Trennung erreicht

TSG : Strictosidinglukosidase

- : nicht auflösbar

TUG : unspezifische Glukosidase

Wenn zwei Aktivitätspeaks nicht bis zur Basislinie getrennt sind, wurden sie als nicht auflösbar eingestuft, da es sich nur um analytische Proteinmengen handelte.

Bewertung

Strictosidinsynthese

Für die Strictosidinsynthese kann keiner der beiden Methoden unmittelbar der Vorzug gegeben werden.

Je ein weiteres untersuchtes Protein wird in GPC und IEC abgetrennt; der Anreicherungseffekt ist etwa gleich.

Strictosidinglukosidase

GPC ist eindeutig effektiver als IEC.

Mit GPC erzielt man schon im ersten Schritt einen hohen Anreicherungseffekt, da der Molekulargewichtsbereich, in dem die Glukosidase eluiert, nicht sehr dicht besetzt ist. Sowohl TiSS als auch TUG werden abgetrennt.

Beides gilt nicht für die IEC.

3.3 Weitere Differenzierung der untersuchten Enzyme

3.3.1 Strictosidinglukosidase

Die vereinigten aktiven GPC-Fractionen werden mit IEC weiter aufgetrennt. Abb. 27 zeigt das erhaltene Elutionsprofil mit eingezeichnetem Aktivitätsverlauf der Strictosidinglukosidase.

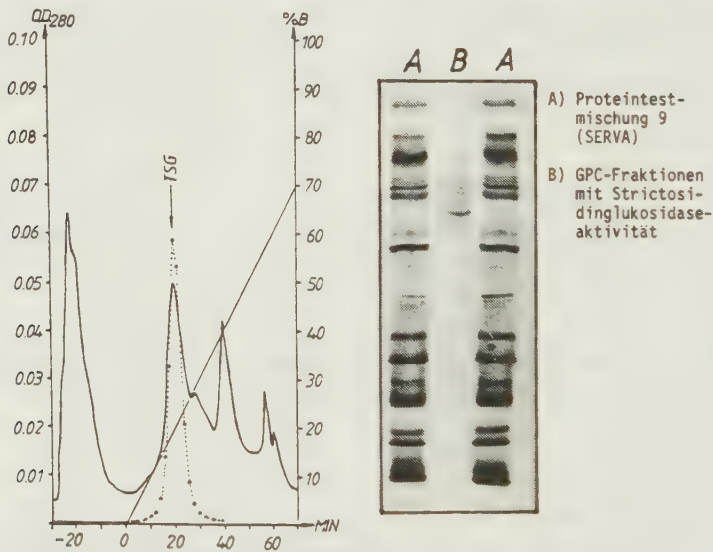


Abb. 27 Elutionsprofil der IEC-Trennung der vereinigten Strictosidinglukosidase-haltigen GPC-Fractionen und IEF-Analyse dieser Fractionen vor der IEC-Trennung im pH-Bereich 3-10

Säule : DEAE=SP500 (10 x 250 mm)
 Probe : Strictosidinglukosidase-haltige Fractionen der GPC-Trennung (Abb. 26 / TSG-Peak)
 Vol. : 12 ml Protein : 1 mg (geschätzt)
 Fluß : 1 ml/min
 Elutionsm.: A) 20 mM Kaliumphosphat pH 6.5
 B) Komp. A + 1 M Natriumchlorid

Die Glukosidase eluiert bei etwa 200 mM Natriumchlorid.

Um den Reinigungserfolg zu überprüfen, bieten sich zwei Möglichkeiten an, die beide durchgeführt wurden:

- 1) Rechromatographie der IEC-Fractionen mit GPC
- 2) Dialyse der aktiven IEC-Fractionen und IEF

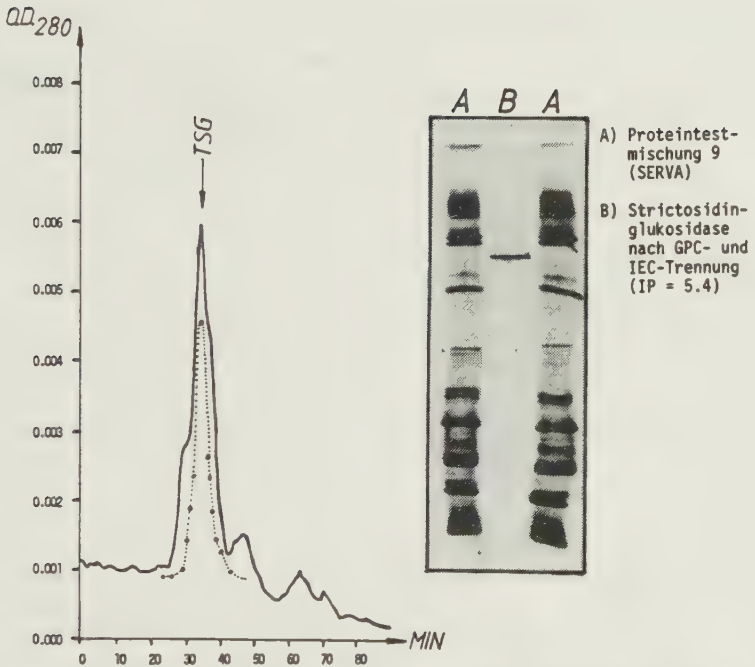


Abb. 28 GPC- und IEF-Analyse (pH 3-10) der IEC-Fractionen mit Strictosidinglucosidase - Aktivität

Säule : TSK G3000SW (21.5 x 600 mm)
Fluß : 3 ml/min
Probe : Fraktion der IEC-Trennung (Abb. 27) mit der höchsten Strictosidinglucosidase-Akt. (TSG)
Vol. : 2 ml
Elutionsm.: 20 mM Kaliumphosphat pH 6.5
10 mM Natriumchlorid

Das IEF-Gel zeigt nur eine Hauptbande, die auch nach der GPC schon deutlich zu erkennen war (vgl. Abb. 27).

Ergebnis

Als Molekulargewicht wurden ca. 200000 Dalton ermittelt und der Isoelektrische Punkt zu pH 5.4 bestimmt.

Die Strictosidinglucosidase läßt sich im analytischen Maßstab durch eine Abfolge von Ammoniumsulfatfällung, GPC und IEC zuverlässig auf einen Gehalt größer 90 % anreichern.

Diese Qualität ist für die meisten biochemischen Untersuchungen bereits ausreichend.

3.3.2 Strictosidinsynthese

Da im Fall der Strictosidinsynthese keiner der beiden Methoden für einen ersten Reinigungsschritt der Vorzug gegeben werden kann, werden deshalb beide Wege weiter verfolgt:

- 1) die aktiven GPC-Fraktionen mit IEC auftrennen
- 2) die aktiven IEC-Fraktionen mit GPC auftrennen

Da die Proben ohne Zwischenkonzentrierung verwendet werden, muß bei der GPC-Analyse sehr empfindlich detektiert werden. Bei der IEC läßt sich das Mengenproblem umgehen, indem man mehrmals injiziert und den Gradienten erst dann startet.

- 1) IEC-Analyse von GPC-Frakt. mit Strictosidinsynth.-Aktivität

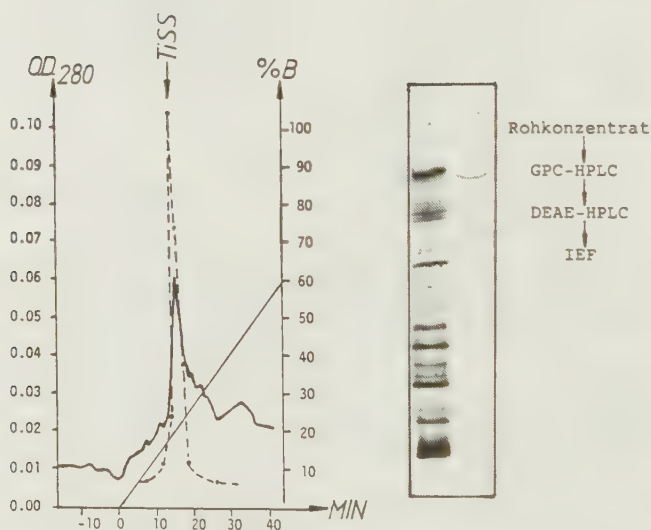


Abb. 29 IEC-Analyse der aktiven Fraktionen der GPC-Trennung und IEF-Analyse des Eluats im pH-Bereich 3-10

Säule : DEAE=SP500 (10 x 250 mm)
 Fluß : 1 ml/min
 Probe : Strictosidinsynthese-haltige Fraktionen der GPC-Trennung (vgl. Abb. 26 / TISS)
 Vol. : 9 ml
 Beladung : 1 mg Protein (geschätzt)
 Elutionsm.: 20 mM Kaliumphosphat pH 6.5
 10 mM Natriumchlorid

2) GPC-Analyse von IEC-Frakt. mit Strictosidinsynth.-Aktivität

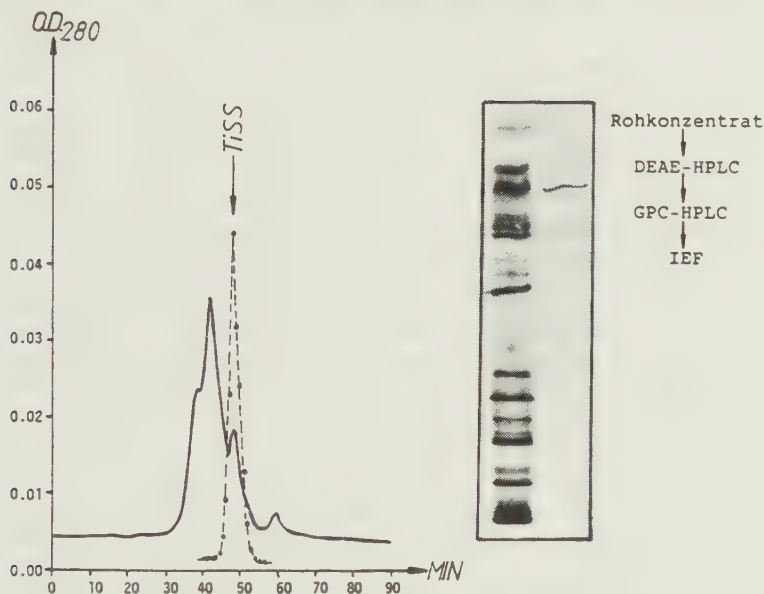


Abb. 30 GPC-Analyse der aktiven IEC-Fractionen (Abb. 25) und IEF-Analyse des Eluats im pH-Bereich 3-10

Säule : TSK G3000SW Fluß : 3 ml/min
 Elutionsm.: 20 mM Kaliumphosphat pH 6.5
 10 mM Natriumchlorid
 Probe : Frakt. mit der höchsten Strictosidinsynthase-
 Aktivität der IEC-Trennung (Abb. 25 / TiSS)
 Vol. : 2 ml Beladung : 0.3 mg (geschätzt)

Ergebnisse

Für die Strictosidinsynthase wurde ein Molekulargewicht von ca. 33000 Dalton und ein Isoelektrischer Punkt von pH 4.5 ermittelt.

Die Kombination GPC, gefolgt von IEC, erbringt im analytischen Maßstab eine Anreicherung der Strictosidinsynthase bis zur Homogenität.

Etwas schlechtere Ergebnisse sind durch die umgekehrte Reihenfolge der Trennungen zu erzielen. Aber auch hier liegt der Anteil der Verunreinigungen unter 1% des Gesamtproteins.

4. Isolierung der Strictosidinsynthese aus Suspensionszellkulturen von Rauwolfia serpentina

4.1 Übersicht ergänzender Reinigungsmethoden

Basierend auf der Kenntnis von Isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht von TISS sind die Kernzüge der Isolierung dieses Enzyms vorgezeichnet. Auf der Grundlage des analytischen Verfahrens, das eine Reinigung zur Homogenität ermöglichte, müssen Wege gefunden werden, die Kapazität dieser Prozedur etwa um den Faktor 1000 zu steigern, damit statt einiger Mikrogramm einige Milligramm dieses Enzyms gereinigt werden können. In der folgenden Abbildung sind die grundsätzlichen "Scale-up" - Möglichkeiten dargestellt.

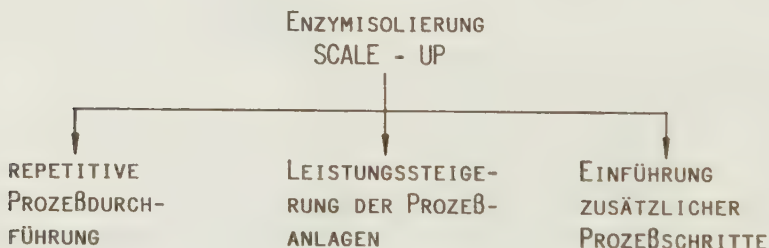


Abb. 31 Kapazitätssteigerungsmöglichkeiten von Verfahren zur Proteinisolierung

a) Repetitive Prozeßdurchführung

Das bedeutet, daß der bereits erfolgreich eingesetzte Prozeß nur mehrmals hintereinander ausgeführt wird.

- kein weiterer Entwicklungsaufwand nötig
- keine zusätzlichen Gerätekosten
- Prozeßzeit und Kapazität stehen in linearem Zusammenhang (2-fache Menge / 2-fache Zeit)

b) Leistungssteigerung der Prozeßanlagen

Die Kapazität eines Prozesses wird dadurch gesteigert, daß die Leistungsfähigkeit der Anlagen dem gewünschten Durchsatz angepaßt wird. Das bedeutet z.B. bei der Säulenchromatographie die Verwendung von Säulen größeren Volumens.

- Entwicklungsaufwand gering
- Kapitaleinsatz meist hoch
- Prozeßzeit bleibt trotz höheren Durchsatzes gleich
- Kapazität wächst linear mit den Säulenvolumen.

Je nach Trennprinzip muß der Querschnitt oder die Länge der Säule vergrößert werden.

(z.B. 2-fache Menge / 1.4-facher Säulendurchmesser)

c) Einführung zusätzlicher Prozeßschritte

Durch zusätzliche Prozeßschritte werden Fremdproteine abgetrennt. Der Reinigungsgang wird soweit zergliedert, daß bei den einzelnen Reinigungsschritten niedrigere Anreicherungs-faktoren ausreichend sind. Die durch Mengenerhöhung auftretende Peakverbreiterung, welche die Anreicherung negativ beeinflußt, wird dadurch kompensiert.

- hoher Entwicklungsaufwand
- geringere Ausbeuten, da jeder zusätzliche Schritt diese vermindert
- Kapitaleinsatz unbestimmt
- Prozeßzeit verlängert sich bei gleichzeitiger Kapazitätssteigerung.

Eine Leistungssteigerung eines Anreicherungsverfahrens ist erreicht, wenn durch Einführung eines zusätzlichen Prozeßschrittes die Prozeßkapazität stärker wächst als die Prozeßdauer.

Die notwendige Kapazitätssteigerung für die Strictosidinsyntheseisolierung nur durch die beiden erstgenannten Möglichkeiten zu erreichen, ist technisch nicht machbar.

Um z.B. eine 1000-fache Kapazitätssteigerung bei der Säulenchromatographie zu realisieren, müßte der Durchmesser einer Säule ungefähr auf das 30-fache vergrößert werden, d.h., es

wäre eine Säule gleichen Materials mit einem Durchmesser von 600 mm anstatt von 20 mm nötig.

So bleibt nur die aufwendigere Möglichkeit nach weiteren, für die Strictosidinsynthese geeigneten Reinigungsschritten zu suchen, die Proteingemische nicht nach Molekulargewicht bzw. Isoelektrischem Punkt auftrennen.

4.1.1 Hydrophobe Chromatographie

Als Adsorbens für die hydrophobe Chromatographie wurde Phenylsepharose CL-4B (1) gewählt.

Sowohl in der Literatur (ANDERSON (1980), BENAJIBA u. MAROUX (1980), BIGELIS u. UMBARGER (1975)) wie auch in der Gebrauchsanleitung des Herstellers wird Ammoniumsulfat als Hilfsmittel vorgeschlagen, da es den starken aussalzenden Effekt des Sulfations mit den sehr geringen chaotropen Eigenschaften des Ammoniumions verbindet. Bei den beträchtlichen zu verarbeitenden Volumen Proteinlösung stellen die notwendigen Ammoniumsulfatmengen einen nicht zu unterschätzenden Kostenfaktor dar. Deshalb wurde versucht, dieses durch normales Kochsalz, wie es im Lebensmittelhandel vertrieben wird (2), zu ersetzen.

Ermittlung der Chromatographiebedingungen

Um festzustellen, bei welcher Kochsalzkonzentration die Strictosidinsynthese vollständig an Phenylsepharose bindet, wurden in verschiedenen Reagenzgläsern zu je 1 ml Adsorbens je 10 ml Rohextrakt mit verschiedenen Kochsalzkonzentrationen zugesetzt und 15 min in den verschlossenen Reagenzgläsern bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Umschütteln inkubiert. Mit den Überständen der einzelnen Ansätze wurden Strictosidinsynthese-Aktivitätstests durchgeführt und nach Auswertung gegen die Kochsalzkonzentration der Proteinlösungen aufgetragen. Die Aktivität des Rohextraktes wurde gleich 100% gesetzt.

(1) PHARMACIA, Freiburg

(2) Die billigsten Speisesalzqualitäten sind am besten geeignet, da ihnen keine wasserunlöslichen Carbonate als Trocknungsmittel zum Erhalt der Rieselfähigkeit zugesetzt sind.

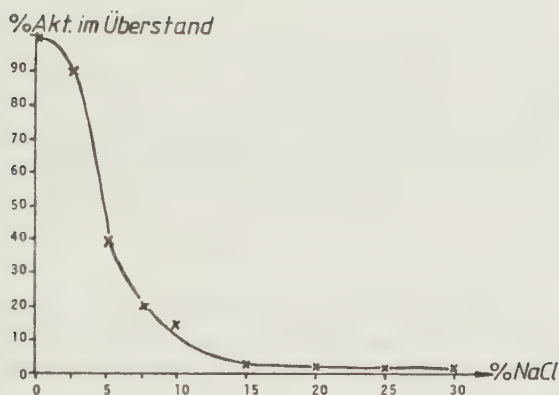


Abb. 32 Bindung von Strictosidinsynthase an Phenyl-sepharose bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen

pro Testansatz: 7 mg Protein
1.5 nkat Strictosidinsynthaseakt.
10 ml Probenvolumen
1 ml Phenyl-Sepharose 4B
Puffer : 20 mM Kaliumphosphat pH 6.5

Um sicherzustellen, daß die Synthaseaktivität nicht nur durch den hohen Salzgehalt inhibiert oder zerstört wurde, und um zu klären, ob an die Phenylsepharose gebundene Synthaseaktivität unter moderaten Bedingungen eluierbar ist, wurden die Überstände der einzelnen Ansätze möglichst vollständig abgesaugt und je 3 ml Wasser den Adsorbenssedimenten zugesetzt.

Nach 15 min Desorbition unter gelegentlichem Umschütteln wurden die Überstände auf Strictosidinsynthase-Aktivität getestet. In allen Ansätzen, in denen die Synthase gebunden hatte, konnte Aktivität wiedergefunden werden.

Für eine quantitative Auswertung ist dieses Verfahren nicht geeignet.

Säulenchromatographie mit Phenylsepharose CL-4B

Wie aus Abb. 32 zu ersehen ist, bindet Strictosidinsynthase bei einem Kochsalzgehalt von 15 % vollständig an die Phenylsepharose.

Ähnlich wie bei Ionenaustauschern kann in der hydrophoben Chromatographie mit Gradienten fallender Ionenstärke eluiert werden. Da mit hohen Proteinbeladungen gearbeitet werden sollte,

wurde auf die Gradientenelution verzichtet; sie hätte große Adsorbensvolumen erfordert und zu sehr voluminösen Eluatfraktionen geführt.

Die Elution mit einem Stufengradienten entspricht dem "Batch"-Verfahren, hat aber den Vorteil, daß die Abtrennung des Adsorbens entfällt.

Vorbereiten der Probe

Rohextrakt aus Tina30-Gewebe (*R. serpentina*) wird 15 % (G/V) Kochsalz zugesetzt, dieses unter langsamem Rühren aufgelöst und unlösliche und ausgefallene Bestandteile bei 13000 g abzentrifugiert (1).

Chromatographie

Der vorbereitete Rohextrakt wird über die Säule gepumpt und diese mit 15%-iger Kochsalzlösung in Aufschlußpuffer nachgewaschen, bis im Eluat die Absorption bei 280 nm auf den Anfangswert zurückgegangen ist.

Die Elution des gebundenen Proteins erfolgt mit Aufschlußpuffer.

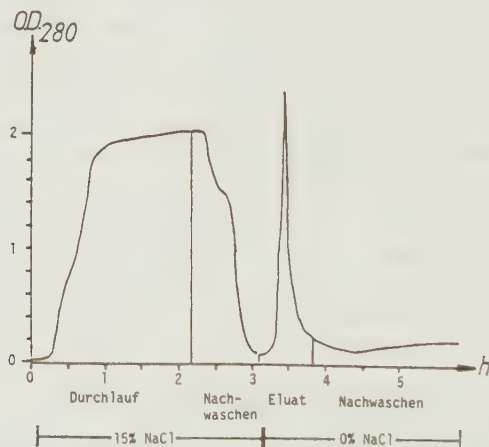


Abb. 33 Elutionsprofil der Hydrophoben Chromatographie an Phenylsepharose CL-4B

Säule : Phenyl-Sepharose 4B (3 x 30 cm)
Fluß : 2 ml/min Puffer : 20 mM K-Phosphat pH 6.5
Beladung : 950 ml Rohextrakt, entspr. 144 mg Prot.

(1) z.B. Sorvall GSA-Rotor, 9000 Upm, 4°C

Auswertung

Um den Erfolg der Anreicherung zu kontrollieren und zu quantifizieren, wird in den einzelnen Fraktionen die Synthaseaktivität und der Proteingehalt bestimmt und die Ergebnisse in einer Anreicherungstabelle zusammengefaßt.

	Vol.	Akt.	Prot.	spez. Akt.	Ausb.	Anr.
	ml	nkat	mg	nkat/mg	%	
Rohextrakt	950	100	144	0.7	100	1
Rohextrakt + 15% NaCl	1000	138	97	1.4	-	-
Durchlauf	940	0	4	-	-	-
Nachwasch	475	0	0	-	-	-
Eluat	67	94	56	1.7	94	2.2

Tab. 5 Anreicherungstabelle für die Auftrennung von Rohextrakt an Phenylsepharose CL-4B

Ergänzend zu den Aussagen der Anreicherungstabelle wurde der Reinigungserfolg durch Isoelektrische Fokussierung überprüft. Abb. 34 zeigt eine Analyse von konzentriertem Rohextrakt, einem Dialysat des aktiven Eluats der Phenylsepharosesäule und einer Referenzpräparation von TiSS.

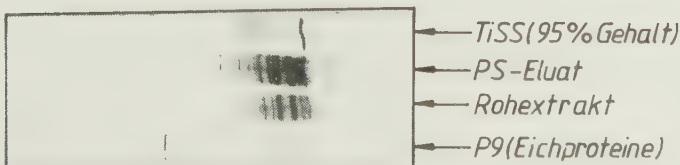


Abb. 34 Isoelektrische Fokussierung von Rohextrakt, Eluat der Phenylsepharosesäule und TiSS-Referenz
pH-Bereich : 3-10

Zusammenfassung

In der Isoelektrischen Fokussierung ist deutlich zu erkennen, daß in der Position von TiSS eine Bande im Eluat der Phenylsepharose-Säule gegenüber dem Rohextrakt hervortritt.

Aus dem Elutionsprofil ist ersichtlich, daß ein großer Teil bei 280 nm absorbierendes Material abgetrennt wird. Die Anreicherungstabelle besagt jedoch, daß im Durchlauf nahezu kein Protein nachzuweisen ist.

Der Durchlauf muß sich also überwiegend aus niedermolekularen Nichtproteinanteilen, wie Alkaloiden und anderen stark absorbierenden und stark geladenen Substanzen, wie DNA und RNA, zusammensetzen.

Im Eluat der Phenylsepharose-Säule erscheint jedoch nur etwa die Hälfte des Proteins der Probe. Das erklärt sich dadurch, daß hydrophobe Proteine unter den gewählten Elutionsbedingungen auf der Säule bleiben. Erst beim Regenerieren der Säule mit Ethylenglykol werden sie eluiert.

Die Aktivitätsausbeute ist höher als 90% und somit ein für chromatographische Verfahren guter Wert. Die Anreicherung ist nur gering, von Vorteil ist jedoch die beträchtliche Volumenverkleinerung auf weniger als 10% des Probenvolumens und die Abtrennung von stärker als Proteine geladenen Substanzen, die bei der Ionenaustauschchromatographie um die Bindungsstellen konkurrieren und die Säulenkapazität für Proteine erniedrigen würden.

Die hohe Salzkonzentration, die nötig ist, damit die Strictosidinsynthase-Aktivität quantitativ an die Phenylsepharose gebunden werden kann, deutet darauf hin, daß es sich um ein sehr hydrophiles Protein handeln muß.

Das Säulenmaterial hat sich als gut regenerierbar erwiesen und zeigte auch nach häufiger Benutzung keine Kapazitätsverluste.

Bewertung

Hydrophobe Chromatographie an Phenylsepharose CL-4B ist eine Methode, die beim vorliegenden Rohextrakt-Proteingemisch, auch ohne Gradientenelution, einen sichtbaren Anreicherungseffekt für die Strictosidinsynthase bei guter Ausbeute ermöglicht.

4.1.2 Affinitätschromatographie

In der Affinitätschromatographie wird die sehr spezifische Bindung eines Enzyms an sein Substrat benutzt, um es von Proteinen abzutrennen, die dazu keine Affinität besitzen.

Im Gegensatz zu Secologanin ist Tryptamin kommerziell erhältlich und chemisch ausreichend stabil, um für die Kopplung an eine aktivierte Matrix benutzt werden zu können.

Die folgenden Gele wurden durch Fixierung von Tryptamin über seine primäre Aminogruppe hergestellt und auf ihre Eignung getestet:

CT - Gel	:	CNBr - aktivierte Sepharose 4B (1)
ET - Gel	:	Epoxyaktivierte Sepharose 6B (1)
ST - Gel	:	CH - Sepharose 4B (1)
HT - Gel	:	Hydroxysuccinimidyl = SP500 (2)

(für die Strukturen der Gele vgl. Seite 37)

Für das Austesten der Bindungskapazität wurde ein Rohextrakt aus Tina30-Gewebe (R. serpentina) hergestellt, durch Ammoniumsulfatfällung von 25 - 50 % konzentriert und grobfractioniert und durch Dialyse entsalzt (entspr. Rohkonzentrat).

Bestimmung der Bindungskapazität der Affinitätsgele

In 1.5 ml Eppendorfgefäße wurden gemischt:

500 µl	Rohkonzentrat (425 µg Prot./ 60 pkat TiSS-Akt.)
70 µl	1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5
0-100 µl	Affinitätsgel
ad 700 µl	Aqua dest.

Die Ansätze wurden für 30 min bei Raumtemperatur in einem Vertikalschüttler bei 10 Upm (3) durchmischt und danach das Adsorbens abzentrifugiert. Aus den Überständen wurden Proben entnommen und im Standardtest auf Strictosidinsynthaseaktivität getestet. Die Aktivität der Probe ohne Adsorbenszusatz wurde gleich 100 % gesetzt und die anderen Ansätze darauf bezogen.

{1} PHARMACIA, Freiburg
{2} SERVA, Heidelberg
{3} HEIDOLPH, Reax II

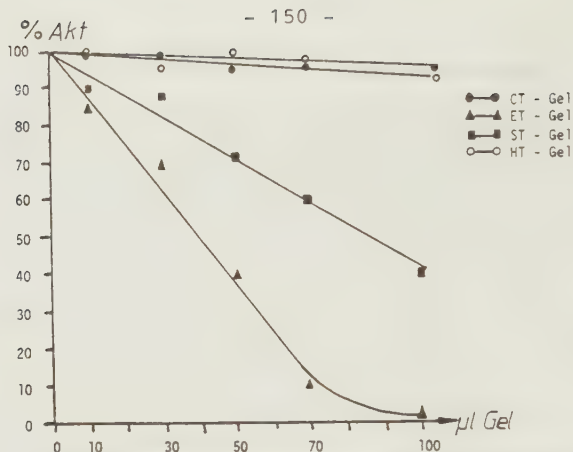


Abb. 35 Vergleich der Bindungskapazität unterschiedlicher Affinitätsgele für die Strictosidinsynthese

pro Testansatz: 425 µg Protein
 60 pkat Strictosidinsynthese-Akt.
 Inkubation : 30 min bei Raumtemperatur
 Struktur der Affinitätsadsorbentien : siehe Seite 37

Strictosidinsynthese zeigt nur minimale Affinität zu CT- und HT-Gel, hohe Affinität jedoch zu ST-Gel und zu ET-Gel.

Auswertung

Die kurzen Spacermoleküle der Trägermaterialien des CT- und HT-Gels verhindern offensichtlich die Bindung der Strictosidinsynthese. Da ET- und ST-Gel gleiche Spacerlänge haben, ist der hydrophile Spacer des ET-Gels wahrscheinlich für die deutlich höhere Bindungskapazität verantwortlich.

ET-Gel ist das geeignetste der getesteten Adsorbentien.

Ermittlung der Elutionsbedingungen für ET-Gel

Neben der Bindungskapazität ist das Desorptionsverhalten maßgebend. Zu dessen Bestimmung wurden kleine 2.5 ml Säulen verwendet, die mit je 2 ml Rohkonzentrat (entspr. 1700 µg Prot. / 240 pkat Strictosidinsynthese-Akt.) beladen und mit Aufschlußpuffer gewaschen wurden. Zur Desorption wurden folgende Reagenzien getestet:

- | | |
|--------------------|----------------------------------|
| 30 % Ethylenglykol | - Erniedrigung des Dipolmomentes |
| 1 % Tryptophan | - Substratanaloges |
| 1 % Tryptamin | - Substrat |
| 1 % NaSCN | - Chaotrope Elution |

Nach Dialyse der Eluate gegen Aufschlußpuffer wurden Protein und Aktivität bestimmt.

	Protein µg	Aktivität pkat	Anreicherung
Rohkonzentrat	1700	242	1
30% Ethylenglykol	15	-	-
1% Tryptophan	40	-	-
1% Tryptamin	50	142	20-fach
1% NaSCN	140	80	4-fach

Tab. 6 Anreicherung der Strictosidinsynthese durch Affinitätschromatographie

Die angegebenen Anreicherungs-faktoren sind mit relativ großen Fehlergrenzen behaftet, da auch durch extensive Dialyse adsorbiertes Tryptamin nicht vollständig vom eluierten Protein abgetrennt werden konnte, wie eine GPC-HPLC Analyse zeigte. Der relativ hohe K_m -Wert von TiSS von 4 mM für Tryptamin ist dafür verantwortlich.

Das verschleppte Tryptamin stört sowohl beim Proteintest, es reagiert ebenfalls mit den gängigen Reagenzien, als auch beim Aktivitätstest, da es die spezifische Aktivität des eingesetzten radioaktiv markierten Tryptamins vermindert und dadurch zu niedrige Aktivitätsangaben verursacht.

Die realen Anreicherungs-faktoren sind also sehr wahrscheinlich höher als die angegebenen.

Zur Überprüfung des Reinigungserfolges sind elektrophoretische Verfahren besser geeignet, da durch die hohen Feldstärken das Tryptamin vom Protein getrennt werden kann.

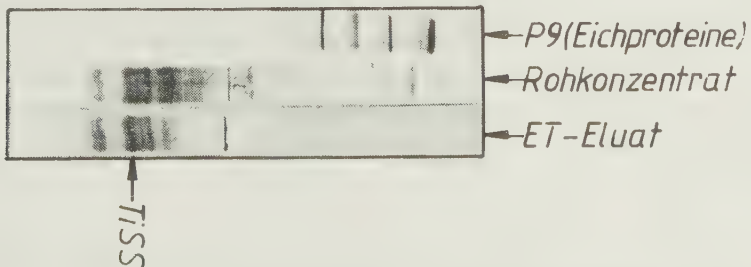


Abb. 36 IEF-Analyse (pH-Bereich 3-10) von Rohkonzentrat und Tryptamin-Eluat der ET-Säule

Zusammenfassung

Affinitätschromatographie mit immobilisiertem Tryptamin erbringt sehr gute Anreicherungsfaktoren und ist mit wenig technischem Aufwand durchführbar, da ein Chromatographiesystem für isokratische Elution genügt.

Auf Grund der Tryptaminspezifität kann man erwarten, daß auch andere in die Indolalkaloidbiosynthese involvierte Enzyme Affinität zu diesem Material zeigen. Für die Analytik dieser Enzyme stellt es eine interessante Anreicherungsmöglichkeit dar.

Von Nachteil für die vorliegende Problemstellung ist, daß das gebundene Tryptamin nur sehr schwer von TiSS zu entfernen ist. Protein- und Aktivitätstest werden beeinflußt und erschweren die Quantifizierung und Kontrolle des Verfahrens erheblich.

Bewertung

Für die Analyse von Proteinen der Indolalkaloidbiosynthese ist dieses Material sehr gut geeignet.

Präparativen Anwendungen stehen das zeitraubende Testverfahren für die Anreicherungskontrolle und Auswahl der aktiven Fraktionen bei der Chromatographie und der hohe Preis des Säulenmaterials Epoxyaktivierte Sepharose 6B entgegen.

4.1.3 Immunaффinitätschromatographie

Immunaффinitätschromatographie ist ein hochspezifisches Reinigungsverfahren für Proteine. Für TiSS wurden die Versuche analog zu den von PFITZNER (1984) beschriebenen Arbeiten durchgeführt. Die Aktivitätsausbeuten lagen bei etwa 10% und damit noch ungünstiger als die von PFITZNER erzielten.

Zur Elution mußte 6 M Guanidinium-Hydrochlorid verwendet werden, was wahrscheinlich für die hohen Aktivitätsverluste verantwortlich war (1). Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der Eluate zeigte denn auch, daß das Protein zwar eluiert wurde, aber nicht mehr katalytisch aktiv war.

(1) 6 M Guanidinium-HCl wird auch zur Inhibierung der besonders stabilen RNasen verwendet, woraus die Wirkung auf andere Enzyme abgeleitet werden kann.

Bei den verwendeten Antikörpersäulen mußte innerhalb weniger Läufe ein fast vollständiger Verlust an Bindungskapazität und Selektivität beobachtet werden.

Bewertung

Die nötigen Elutionsbedingungen bei Verwendung von polyklonalen Seren sind sowohl für das zu reinigende Protein als auch für die gebundenen Antikörper zu stark denaturierend. Da der Aufwand für die Herstellung der Immunaффinitätssäulen in keinem Verhältnis zum erzielbaren Reinigungserfolg stand, kam ein Einsatz für die präparative Enzymisolierung nicht in Betracht.

4.1.4 Beurteilung der untersuchten Techniken zur Isolierung der Strictosidinsynthase aus R. serpentina

Die Immunaффinitätschromatographie, das selektivste Anreicherungsverfahren, war nicht für präparative Reinigungen geeignet. Um Aktivitätsverluste gering zu halten, muß das Enzym unter milden Bedingungen eluierbar sein. Das könnte man wahrscheinlich mit monoklonalen Antikörpern erreichen, die auf niedrige Affinität selektiert wurden. Mit polyklonalen Seren ist die Effizienz zu gering.

Die Affinitätschromatographie zeigte einen überraschend hohen Anreicherungseffekt, doch die schwerfällige Kontrolle des Chromatographieergebnisses (es muß immer erst extensiv dialysiert werden, bevor die Aktivitäts- und Proteintests durchgeführt werden können) behindert den zügigen Fortgang der Enzymisolierung. Dieses Verfahren ist für analytische Reinigungen hervorragend geeignet, jedoch, auch wegen der hohen Materialkosten, nicht für präparative.

Die hydrophobe Chromatographie war die einzige Methode, die auch für präparativen Einsatz geeignet erschien. Dem Mangel an Selektivität stehen Robustheit des Materials und niedrige Kosten gegenüber.

4.2 Präparative Isolierung der Strictosidinsynthase

Basierend auf den Ergebnissen des analytischen Anreicherungsverfahrens, bei dem der Isoelektrische Punkt und das Molekulargewicht der Strictosidinsynthase ermittelt wurden (vgl. Seite 130 ff), und der Untersuchung weiterer Reinigungsmethoden für dieses Protein (vgl. Seite 142 ff) wurde ein Anreicherungsverfahren konzipiert und optimiert, dessen Schritte im folgenden einzeln beschrieben sind.

Eine summarische Zusammenfassung und Quantifizierung der einzelnen Reinigungsschritte in Form einer Proteinanreicherungstabelle findet sich am Ende dieses Abschnitts.

4.2.1 Rohextraktbereitung

Aus 2.5 kg Gewebe von *Tina30* (R. serpentina) wurde mit 2.5 l Kaliumphosphatpuffer (25 mM / pH 6.5) ein Rohextrakt nach der auf Seite 28 ff beschriebenen Methode hergestellt.

<u>Rohextrakt</u>	Volumen: 6.5 l	Akt. (TiSS): 1000 nkat
	Protein: 4.8 g	spez. Akt. : 0.2 nkat/mg

Bei diesem Schritt wird ein Großteil der Alkaloide abgetrennt und die Proteinlösung von Schwebstoffen befreit.

4.2.2 Abtrennen der Fraktion der sauren Proteine

Mit Hilfe von Flüssigkeitschromatographie an DEAE - Material wurde die Fraktion der sauren Proteine, wie auf Seite 31 beschrieben, aus dem Rohextrakt abgetrennt.

<u>DEAE-Eluat</u>	Volumen: 800 ml	Akt. (TiSS): 830 nkat
	Protein: 2 g	spez. Akt. : 0.4 nkat/mg

Das Hauptziel dieses Schrittes ist die Reduzierung des mehrere Liter großen Volumens der Proteinlösung; der geringe Anreicherungsfaktor wird dabei in Kauf genommen.

Dieser Schritt entspricht der sonst üblichen Ammoniumsulfatfällung.

4.2.3 Hydrophobe Chromatographie

Mittels hydrophober Chromatographie wird eine weitere Volumenreduzierung bei gleichzeitiger Anreicherung erzielt.

Ein typisches Elutionsprofil und eine Beschreibung des Chromatographieprozesses findet sich auf Seite 144.

Das Eluat der Phenylsepharosesäule wird für 12 h bei 4°C gegen Startpuffer der Ionenaustausch-HPLC (25 mM Tris/Acetat pH 6.5) dialysiert.

<u>Rohkonzentrat</u>	Volumen: 75 ml	Akt.(TiSS): 690 nkat
	Protein: 470 mg	spez.Akt. : 1.5 nkat/mg

So aufgearbeiteter Rohextrakt, hier als Rohkonzentrat bezeichnet, ist die beste Lagerform für Strictosidinsynthese. Er verbindet hohe Strictosidinsyntheseaktivität pro Volumen mit vollkommener Schwebstofffreiheit und Abwesenheit von Inhaltsstoffen, die irreversibel an HPLC-Trägermaterialien binden könnten.

Rohkonzentrat stellt deshalb ein geeignetes Ausgangsmaterial für die Proteinreinigung mit Protein-HPLC dar, mit deren Hilfe binnen eines Tages aus dieser Vorstufe homogenes Enzym nach Bedarf isoliert werden kann.

4.2.4 Ionenaustausch - HPLC

Um die Trennzeit zu minimieren, wurde ein nichtlinearer Gradient zur Auftrennung von Rohkonzentrat mit IEC-HPLC verwendet. Einem raschen Anstieg folgt noch vor der Elution der Synthese ein Plateau, um alle bereits desorbierten Proteine vollständig aus der Säule auszuwaschen. Der Bereich, in dem die Elution der Syntheseaktivität zu erwarten ist, wird mit einem flachen Gradienten überstrichen, dem ein Sprung auf 100 % Komponente B folgt.

Das Puffersystem des Laufmittels wurde gegenüber den analytischen Trennungen verändert:

Komponente A : 25 mM Tris/Acetat pH 6.5

Komponente B : 25 mM Tris/Acetat pH 6.5

500 mM Natriumacetat

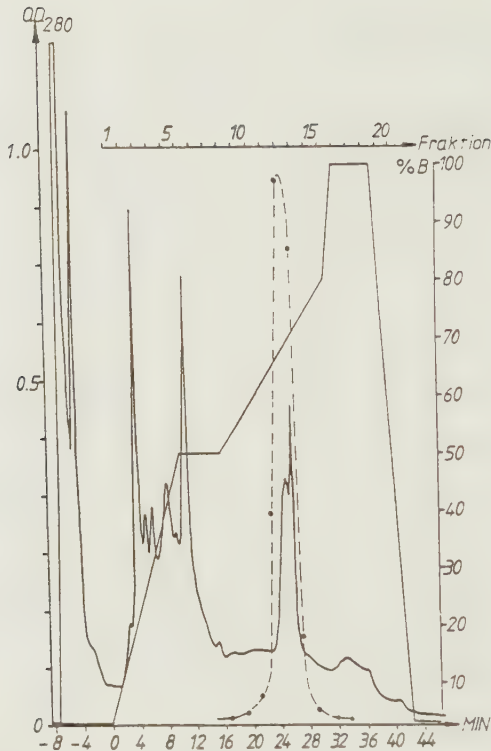


Abb. 36 Chromatogramm der IEC-Trennung von Rohkonzentrat

Synthaseaktivität : gestrichelte Linie

Gradientenprofil : durchgezogenen Treppenkurve

Säule : DEAE=SP500 (10 x 250 mm)

Fluß : 1 ml/min

Probe : 15 ml Rohkonzentrat, entspr. 100 mg Protein

Elutionsm.: A) 25 mM Tris/Acetat pH 6.5

B) Komp. A + 500 mM Natriumacetat

Fraktion 12 und 13 wurden zur weiteren Reinigung direkt zur GPC-Trennung eingesetzt.

DEAE-Fraktionen

(Nr. 12 u. 13)
(aus 5 Läufen)

Volumen: 24 ml

Akt.(TiSS): 560 nkat

Protein: 16 mg

spez.Akt. : 35 nkat/mg

Pro Lauf wurden 100 mg Protein injiziert. Größere Beladungen waren nicht mit der nötigen Auflösung auftrennbar.

Eine Steigerung des Durchsatzes könnte durch Verwendung von Säulen größeren Durchmessers erreicht werden.

4.2.5 Gelpermeations - HPLC

Die aktiven Fraktionen der IEC-HPLC wurden mit GPC-HPLC weiter aufgetrennt.

Um optimale Auflösung zu erzielen (vgl. KATO et.al. (1980 a)), wurde die Flußrate gegenüber der analytischen Trennung auf die Hälfte herabgesetzt, auf 1.5 ml/min.

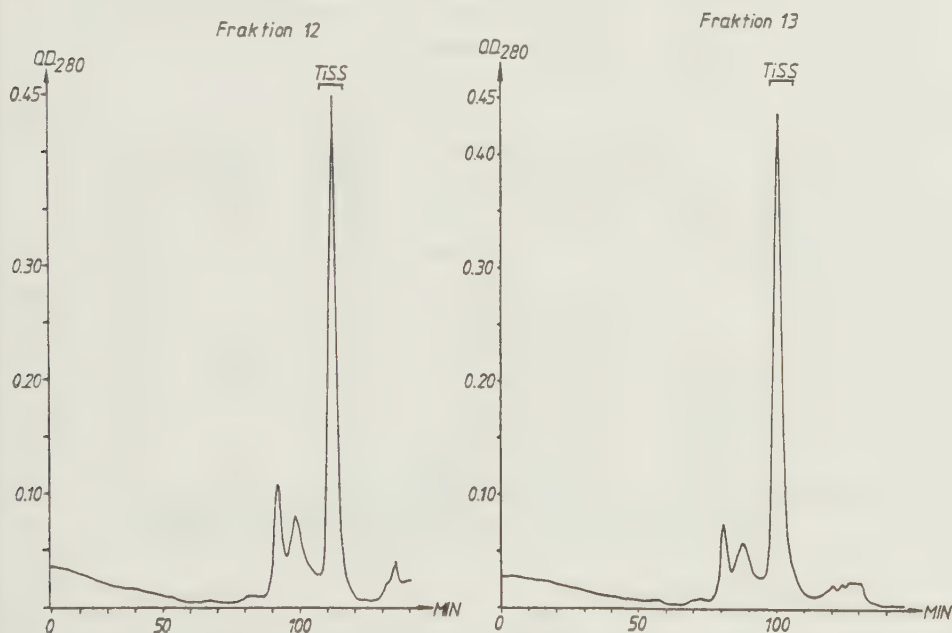


Abb. 37 Elutionsprofile der IEC-Fraktionen 12 und 13 bei der GPC-Trennung

Säule : TSK G3000SW Fluß : 1.5 ml/min
Probe: Volumen : 2 ml (pro Injektion)
Belad. : 1.3 mg

Die markierten Peaks enthalten die Synthaseaktivität. Die Fraktionen wurden vereinigt und auf Reinheit überprüft.

Da der Laufpuffer der GPC-HPLC ein geeigneter Lagerungspuffer für TiSS ist, kann das Enzym ohne Umpuffern eingefroren werden. Für Anwendungen, für die konzentrierteres Enzym benötigt wird, wurden die vereinigten GPC-Fraktionen durch Ultrafiltration eingeeengt.

4.2.6 Anreicherungstabelle

Üblicherweise wird der Erfolg eines Proteinreinigungsganges in einer Anreicherungstabelle zusammengefaßt. Die Effizienz der einzelnen Schritte läßt sich daraus ersehen. Die absoluten Werte der Proteinbestimmungen und der daraus abgeleiteten Größen sind jedoch unter dem Vorbehalt zu betrachten, daß sie nur Relativmessungen gegen BSA darstellen und so mit zunehmender Anreicherung ungenauer werden.

	Vol. ml	Akt. nkat	Prot. mg	spez.Akt. nkat/mg	Aus- beute %	Anrei- cherung
Rohextrakt	6490	1012	4840	0.2	100	1
Cellufina DEAE-AH (IEC)	800	830	2050	0.4	82	2
Phenylsepharose 4B (HIC)	75	690	470	1.5	68	7.5
Dialyse	80	660	460	1.4	65	7
DEAE=SP500 - HPLC (IEC)	24	560	16	35.0	55	175
TSK G3000SW - HPLC + Ultrafiltration (GPC)	2.6	350	1.9	184.0	35	920

Tab. 7 Anreicherungstabelle der präparativen Isolierung der Strictosidinsynthese aus Tina30 (R. serpentina)

4.2.7 Reproduzierbarkeit

Dieses Proteinanreicherungsverfahren wurde, mit kleinen Modifikationen der Laufmittelkomponenten oder Geräteparameter, über einen Zeitraum von mehreren Monaten zur Isolierung von etwa 15 mg Strictosidinsynthese eingesetzt.

4.3 Reinheitskontrolle der Enzympräparationen

Die spezifische Aktivität einer Enzympräparation ist ein sensibles Kriterium für die schonende und effiziente Reinigung eines Enzyms. Sie gibt allerdings noch keine sichere Auskunft über die Abwesenheit von Verunreinigungen.

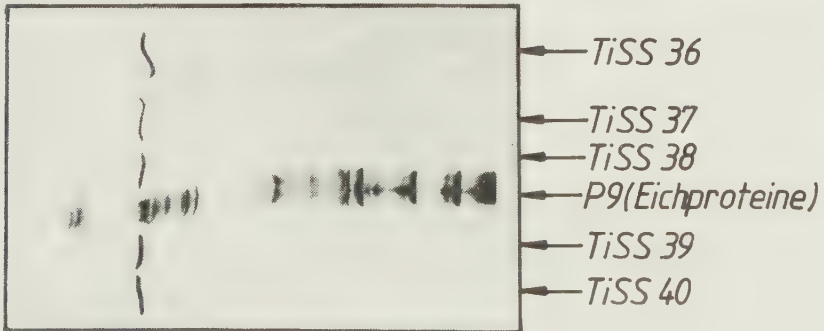
Zur Kontrolle der Enzympräparationen wurden sie mit GPC-HPLC und IEF-Elektrophorese überprüft.

4.3.1 Isoelektrische Fokussierung

Zur Analyse wurden die Bereiche pH 3-10 und pH 4-5 verwendet. Beide Gele können gleichzeitig in einer Flachbettelektrophoresekammer betrieben werden, da Spannung und Trennzeit übereinstimmen (Trennparameter und Färbeprozedur siehe Seite 39).

In dem weiten pH-Bereich kann die Abwesenheit von Proteinen mit mehr als 0.5 pH-Intervallen Unterschied im Isoelektrischen Punkt überprüft werden, im pH-Bereich 4-5 sind auch Proteine mit nur einigen Hunderstel pH-Stufe Differenz detektierbar.

Isoenzyme, wie sie in Suspensionszellkulturen von C. roseus von PFITZNER (1984) beobachtet wurden, würden deutlich getrennt.



Isoelektrische Fokussierung pH3-10

Abb. 38 Isoelektrische Fokussierung von verschiedenen Präparationen von TiSS im Bereich pH 3-10

Die Indizes bei den einzelnen TiSS-Präparationen sind die laufenden Nummern der Isolate.

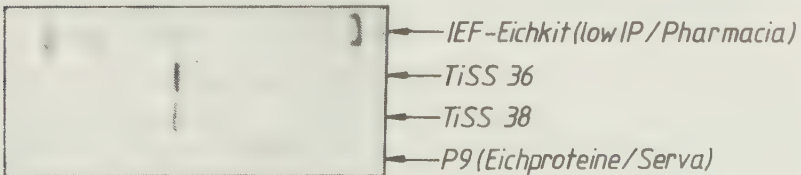


Abb. 39 Isoelektrische Fokussierung von TiSS-Präparationen im Bereich pH 4-5 (Indizes siehe oben)

4.3.2 Gelpermeationsanalyse

Ein Aliquot der Enzymisolate wurde jeweils für eine Gelpermeationsanalyse eingesetzt.

Die Symmetrie des Peaks ist ein zuverlässiges Kriterium für die Uniformität einer Enzympräparation.

Das zur Chromatographie eingesetzte Enzym wird nicht zerstört und kann zurückgewonnen werden. Die Analyse ist also ohne Materialverlust möglich.

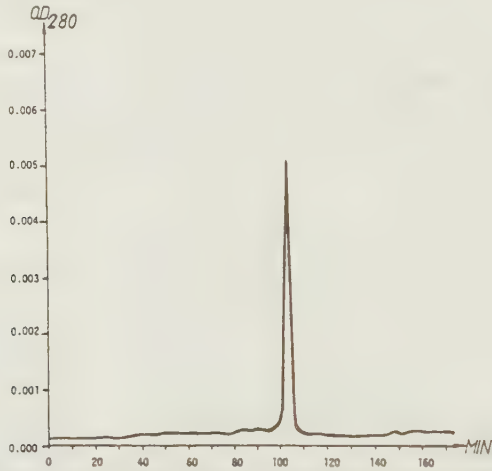


Abb. 40 GPC-Analyse einer TiSS-Präparation aus Tina30-Gewebe (Strictosidinsynthase aus R. serpentina)

Säule: TSK G3000SW (21.5 x 600 mm) Fluß: 1.5 ml/min
Probe: 20 µl homogene TiSS-Präparation, entspr. 15 µg
Elutionsm.: 20 mM K-Phosphat pH 6.5, 10 mM NaCl

Auswertung

In beiden pH-Bereichen der IEF homogene Präparationen, die nur einen, vollkommen symmetrischen, Elutionspeak in der GPC-HPLC haben, können für die Sequenzanalyse verwendet werden.

Isolate, die noch geringe Mengen Fremdprotein enthielten, sind für Stabilitätstests, die Bestimmung der biochemischen Kenngrößen, für Immobilisierungen und als Referenzprotein für die Elektrophorese eingesetzt worden.

5. Charakterisierung der Strictosidinsynthase

Zur Charakterisierung von TiSS wurde, wenn nicht anders angegeben, homogenes Enzym verwendet.

5.1 pH-Optimum

Für die Bestimmung des pH-Optimums wurden Standardenzymtests, wie auf Seite 19 beschrieben, bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Um einen großen pH-Bereich überdecken zu können, mußten verschiedene Puffersysteme verwendet werden.

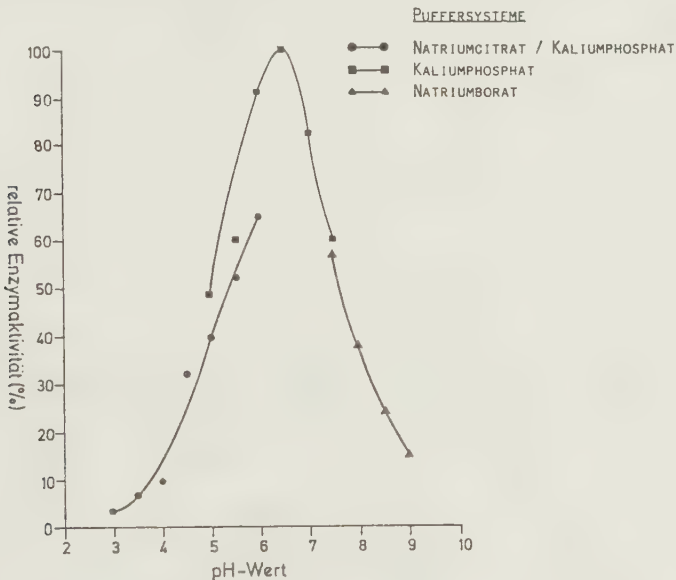


Abb. 41 pH - Optimum der Strictosidinsynthase aus R. serpentina (TiSS)

Standardtestansätze mit je 16.6 pkat Enzymaktivität
Puffer : 100 mM der angegebenen Puffer
Substratkonzentrationen: 0.9 mM Tryptamin
12 mM Secologanin

pH - Optimum : pH 6.5

TiSS zeigt ein relativ breites pH-Optimum mit dem Maximum bei pH 6.5 und einer Halbwertsbreite (1) von 2.5 pH-Stufen.

(1) Abstand in pH-Stufen zwischen den beiden pH-Werten, bei denen 50% der maximalen Enzymaktivität nachweisbar sind.

5.2 Temperaturoptimum

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums wurden Standardenzymtestansätze verwendet, die bei verschiedenen Temperaturen inkubiert wurden.

Um die Einflüsse von temperaturabhängiger Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit und zeit- und temperaturabhängiger thermischer Inaktivierung des Enzyms differenzieren zu können, wurde die Bestimmung des Temperaturoptimums mit verschiedenen Aktivitätsmengen und Inkubationszeiten durchgeführt, wobei das Produkt aus Enzymmenge und Inkubationszeit konstant blieb.

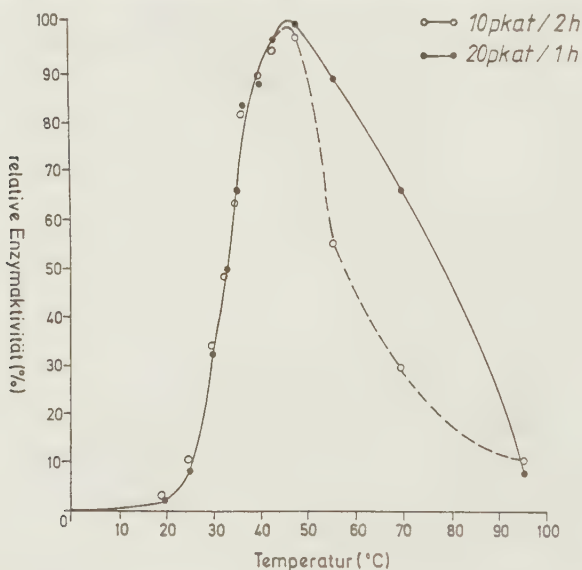


Abb. 42 Temperaturoptimum der Strictosidinsynthase aus *R. serpentina* (TiSS)

Standardtests mit je 10 bzw. 20 pkat Enzymaktivität
Substratkonz.: 0.9 mM Tryptamin, 12 mM Secologanin.
Der Maximalwert der gemessenen Substratumsätze wurde
gleich 100 % gesetzt.

Temperaturoptimum: 45°C.

Die Enzymtests wurden weiterhin bei 37°C durchgeführt; die Aktivität liegt hier bei 85% vom Maximalwert und man ist ausreichend weit von dem Temperaturbereich entfernt, wo die thermische Inaktivierung eine wesentliche Rolle spielt.

5.3 Michaelis-Menten Konstante

Die Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit von der Substratkonzentration wurde für Tryptamin im Bereich 0.03 - 4.05 mM und für Secologanin für Konzentrationen von 0.28 - 12 mM bestimmt. Für die Aktivitätstests wurde einheitlich 16.6 pkat TiSS gemäß Standardtest eingesetzt.

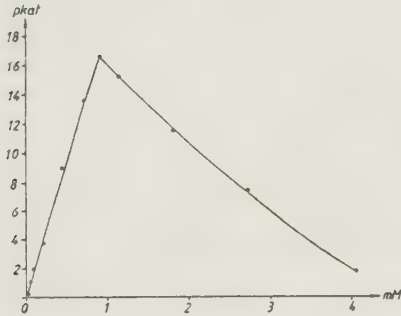


Abb. 43 a

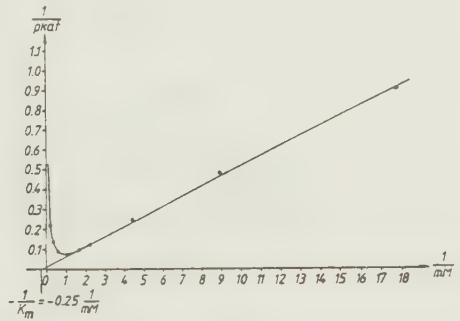


Abb. 43 b

Secologanin : 12 mM konstant
Tryptamin : 0.03 - 4.01 mM

Abb. 43 Einfluß der Tryptaminkonzentration auf die Stric-
tosidinsynthaseaktivität in der Darstellung
nach MICHAELIS u. MENTEN (Abb. 43 a)
und LINEWEAVER u. BURK (Abb. 43 b)

Je 16.6 pkat Enzymaktivität gemäß Standardtest
pro Testansatz

$$K_m (\text{Tryptamin}) = 4 \text{ mM}$$

Bei Tryptaminkonzentrationen über 1 mM tritt starke Substrathemmung auf. Die Aktivität steigt linear bis zu 0.9 mM Tryptamin an, um nach einem scharfen Maximum, ebenfalls nahezu linear, wieder abzufallen.

Für die Bestimmung der Aktivitätsabhängigkeit von der Secologaninkonzentration wurde wegen der beobachteten starken Substrathemmung eine Tryptaminkonzentration von 0.9 mM gewählt und nicht, wie von der Theorie gefordert, Sättigung mit Tryptamin.

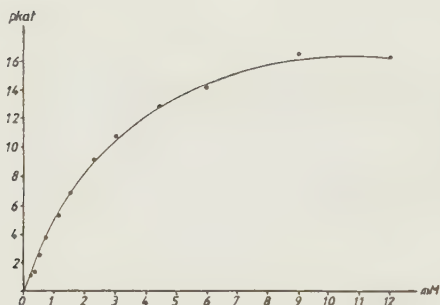


Abb. 44 a

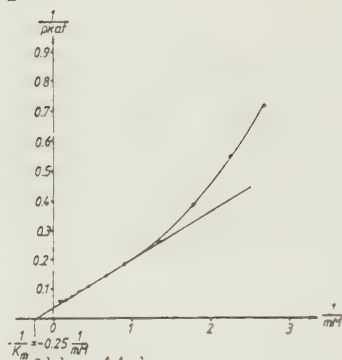


Abb. 44 b

Tryptamin : 0.9 mM konstant
Secologanin : 0.28 - 12 mM

Abb. 44 Einfluß der Secologaninkonzentration auf die
TiSS-Aktivität
MICHAELIS - MENTEN Diagramm (Abb. 44 a)
LINEWEAVER - BURK Diagramm (Abb. 44 b)

Je 16.6 pkat Enzymaktivität gemäß Standardtest
pro Testansatz

K_m (Secologanin) = 4 mM

Aus dem LINEWEAVER - BURK Diagramm muß auf Vorliegen von posi-
tiver Kooperativität geschlossen werden, was sich in der Auf-
tragung nach HILL bestätigt.

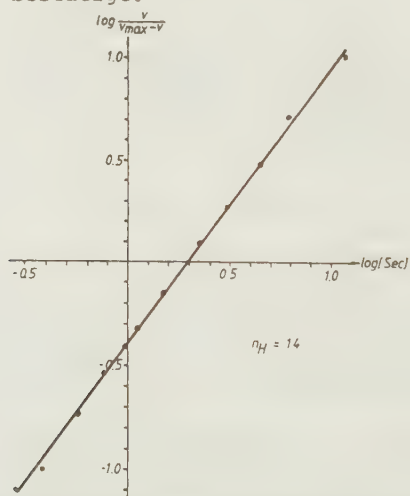


Abb. 45 Abhängigkeit der Enzymaktivität von TiSS von der
Secologaninkonzentration in der HILL-Darstellung
(Daten aus Abb. 43 und 44)

HILL - Koeffizient $n_H = 1.4$.

Aus den LINEWEAVER - BURK Diagrammen ergibt sich ein K_m -Wert von 4 mM sowohl für Secologanin wie auch für Tryptamin.

Diese Werte gelten unter dem Vorbehalt, daß nicht unter Substratsättigung des zweiten Substrats gemessen werden konnte.

5.4 Wechselzahl

Die Wechselzahl gibt, an wieviele Einzelreaktionen pro Zeiteinheit pro Enzymmolekül katalysiert werden.

WZ	=	Wechselzahl	(1/min)
SA	=	spez. Aktivität	(nkat/mg)
MW	=	rel. Molekularmasse	(g/mol)

Homogene Enzympräparationen haben eine spezifische Aktivität von 150 nkat/mg. Die relative Molekularmasse des Enzyms ist 30000 Dalton (vgl. Seite 168).

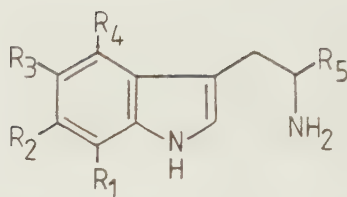
$$\begin{aligned} WZ &= SA \times MW = 150 \text{ nkat/mg} \times 30000 \text{ g/mol} \\ &= 4.5 \text{ kat/mol}_{\text{Enzym}} \\ &= 270 \text{ mol}_{\text{Produkt}} / (\text{mol}_{\text{Enzym}} \times \text{min}) \end{aligned}$$

Die Wechselzahl des Enzyms ist 270, d.h. die Bildung von 270 Molekülen Strictosidin pro Minute wird unter Standardbedingungen von einem Molekül Strictosidinsynthase katalysiert.

5.5 Substratspezifität

Zur Bestimmung der Substratspezifität wurden die in der folgenden Tabelle aufgelisteten Substanzen in 9 mM Lösung in Standardtests mit 50 pkat Enzym und 1.2 μmol 7-³H-Secologanin (296 GBq / mol) eingesetzt. Nach 2 h Inkubation bei 37°C wurden die Ansätze zusammen mit Referenzproben ohne Enzym dünnsschichtchromatographisch aufgetrennt (1) und die Aktivitätsverteilung der einzelnen Spuren mit einem Dünnschichtscanner vermessen (2).

-
- (1) MACHEREY & NAGEL: Polygram Sil G / UV254
Laufmittel: Chloroform / Methanol = 4 / 1
(2) BERTHOLD : LB 2832 Automatic TLC Linear Analyser



	R1	R2	R3	R4	R5
Serotonin	H	H	OH	H	H
Tryptophan	H	H	H	H	COOH
	OCH3	H	OCH3	H	CH3
	H	H	CH3	CH3	H
	H	H	OCH3	CH3	H
	CH3	CH3	H	H	CH3
	CH3	H	H	CH3	CH3
	CH3	H	CH3	H	CH3
	H	H	OCH3	CH3	CH3

Tab. 8 Tryptaminderivate zur Bestimmung der Substratspezifität der Strictosidinsynthase aus *Tina30* (*R. serpentina*)

Keines der eingesetzten Tryptaminderivate wurde umgesetzt.

Zur Überprüfung der Substratspezifität gegenüber des Monoterpenanteils standen keine Derivate von Secologanin zur Verfügung.

5.6 Enzymstabilität

Die Langzeitstabilität des Enzyms wurde mit Proben gleicher Aktivität einer Rohpräparation und homogenen Enzyms bestimmt, die bei verschiedenen Temperaturen gelagert und deren Aktivität regelmäßig bestimmt wurde.

Um mikrobiologischen Abbau zu verhindern, wurden die Enzymlösungen in keimfreie 1.5 ml Eppendorfgefäße sterilfiltriert. Die Verdünnung homogenen Enzyms mußte vorher mit BSA auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt werden, damit beim Sterilfiltrieren der Lösung keine Strictosidinsynthaseaktivität durch Adsorption an die Filtermembran verloren ging.

Abbildung 46 zeigt die beobachteten Aktivitätsabnahmen bei den verschiedenen Lagerungstemperaturen und eine tabellarische Zusammenfassung der ermittelten Halbwertszeiten der Enzymaktivität. Bei Lagerung der Proben bei -20°C konnte keine Abnahme der Enzymaktivität während der Beobachtungszeit festgestellt werden.

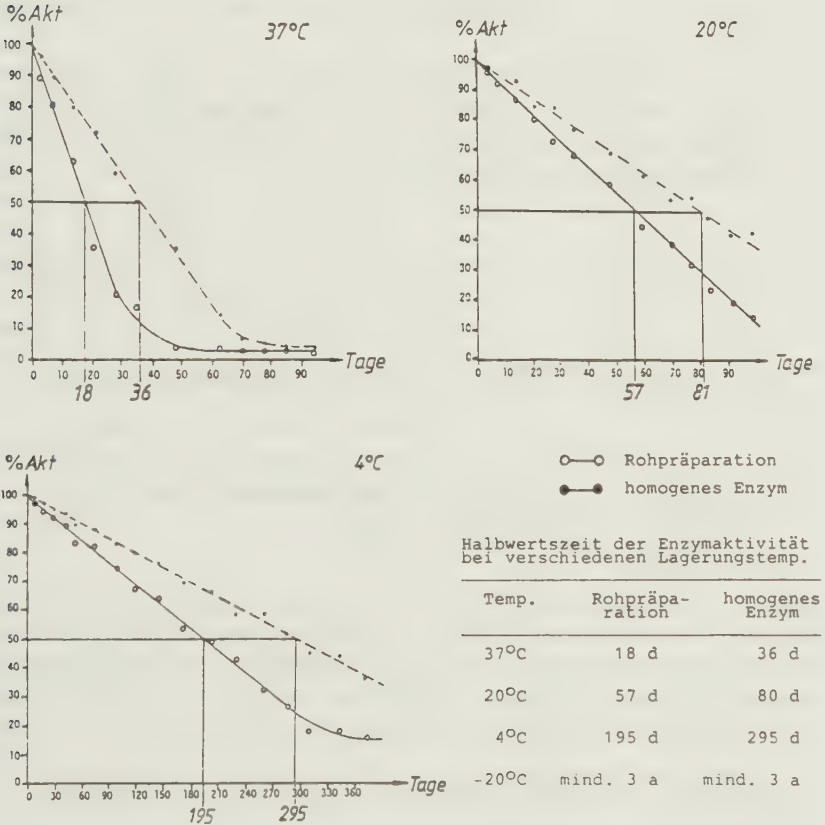


Abb. 46 Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Zeit bei verschiedenen Lagerungstemperaturen

Die bei verschiedenen Temperaturen gelagerten Proben hatten zu Beginn der Messungen einheitlich 55 pkat Enzymaktivität. Homogenes Enzym enthält 1 mg/ml BSA, um es sterilfiltrieren zu können.

5.7 Molekulargewicht

5.7.1 SDS - Gelelektrophorese

In der Literatur wird meist SDS-Elektrophorese zur Ermittlung des Molekulargewichtes eines Proteins verwendet.

Da es sich jedoch bei TiSS um ein Glykoprotein handelt (vgl. Seite 171), ist SDS-Elektrophorese zur Bestimmung des Molekulargewichtes nur von beschränkter Aussagekraft (BETTELHEIM (1977)).

Durch die Kohlenhydratkomponenten bildet sich eine größere Hydrathülle des Proteins aus und die Anlagerung von SDS wird vermindert. Dadurch ergeben sich für Glykoproteine in der SDS-Gelelektrophorese zu hohe Molekulargewichte.

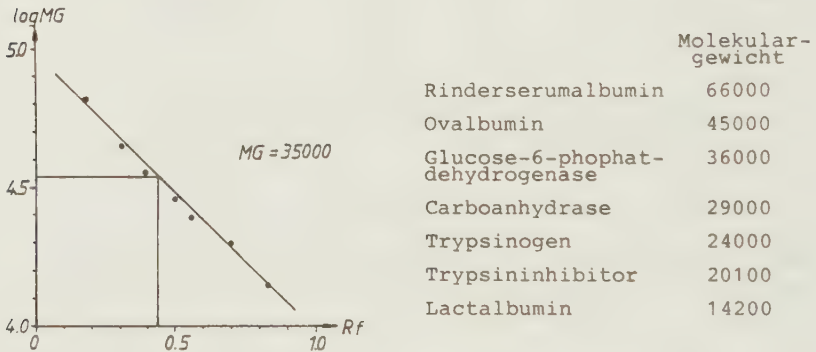


Abb. 47 SDS-Elektrophorese von TiSS nach LAEMMLI (1970)

Die SDS-Gelelektrophorese ergab eine relative Molekularmasse von 35000 Dalton für TiSS und zeigte, daß sich das Enzym nicht aus Untereinheiten zusammensetzt.

5.7.2 Gelpermeationschromatographie

Bei der Gelpermeationschromatographie beeinflussen Kohlenhydratanteile eines Proteins die Analyse nicht.

Analog zur SDS-Elektrophorese wird das Molekulargewicht durch Interpolation zu den Elutionszeiten von Proteinen bekannter Größe ermittelt.

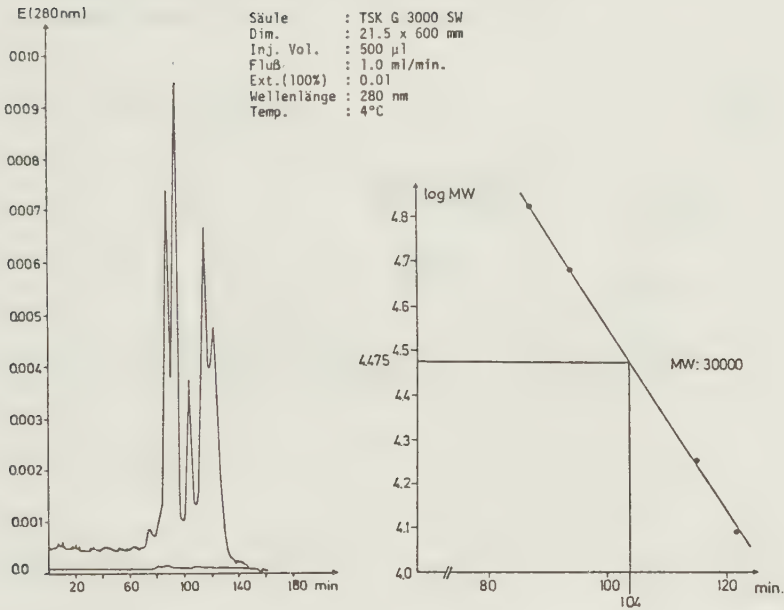


Abb. 48 Molekulargewichtsbestimmung mit GPC-HPLC

Referenzproteine: Rinderserumalbumin MG = 66000
Ovalbumin MG = 45000
Myoglobin, Pferd MG = 17800
Cytochrome-C, Pferd MG = 12300

Für die Strictosidinsynthese aus R. serpentina ergibt sich ein relatives Molekulargewicht von 30000.

Der durch Gelpermeationschromatographie bestimmte Wert ist als das tatsächliche Molekulargewicht anzusehen, da diese Analysenmethode nicht durch Kohlenhydratanteile beeinflusst wird.

5.8 Isoelektrischer Punkt

Zur Bestimmung des Isoelektrischen Punktes wird das zu charakterisierende Protein zusammen mit Referenzproteingemischen (1) in einer Isoelektrischen Fokussierung aufgetrennt.

(1) z.B. SERVA, Protein Testsubstanzen zur pI-Bestimmung

Tabellen, die von den Herstellern der Eichsätze mitgeliefert werden, kann der Isoelektrische Punkt durch Vergleich mit den Positionen der Banden der Referenzproteine entnommen werden.

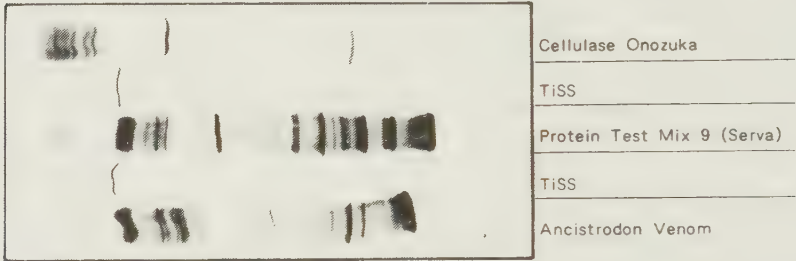


Abb. 49 Bestimmung des Isoelektrischen Punktes der Strictodinsynthese aus *R. serpentina* durch isoelektrische Fokussierung im pH-Bereich 3 - 10 zusammen mit Referenzproteinmischungen

Isoelektrischer Punkt : IP = 4.5

5.9 Aminosäurezusammensetzung

Die Aminosäureanalyse wurde, wie auf Seite 41 ff beschrieben, durchgeführt.

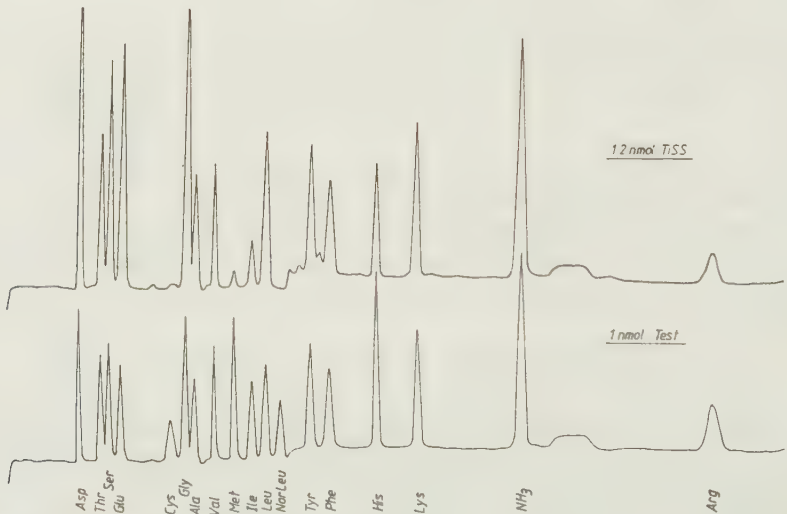


Abb. 50 Aminosäuretrennung des Hydrolysates der Strictodinsynthese und eines Testgemisches

Aus den prozentualen Anteilen der einzelnen Aminosäuren wurde deren Anzahl pro Enzymmolekül (MG = 30000) errechnet und auf ganze Zahlen gerundet.

AS	%	N	AS	%	N
Cys	1.42	4	Met	1.51	4
Asp/Asn	9.99	27	Ile	4.65	13
Thr	4.78	13	Leu	7.23	20
Ser	6.22	17	Tyr	3.84	11
Glu/Gln	11.25	31	Phe	4.23	12
Pro	5.39	15	His	8.34	23
Gly	12.44	34	Lys	4.88	13
Ala	5.34	15	Arg	1.46	4
Val	5.41	15	Trp	1.62	4

Tab. 9 Aminosäurezusammensetzung der Strictosidinsynthese aus R. serpentina

Aus dieser Tabelle errechnet sich, daß die Strictosidinsynthese eine Polypeptidkette mit einer Gesamtlänge von circa 275 Aminosäuren ist.

5.10 Nachweis der Glykoproteineigenschaft

Identifizierung und Quantifizierung der Zucker

5.10.1 Schiff's Reagenz

Zum qualitativen Nachweis von Kohlenhydratanteilen eines Proteins eignet sich die Farbreaktion mit Schiff's Reagenz. Nach isoelektrischer Fokussierung in Ultradünnschichtgelen des pH-Bereichs 3-10 wurde die Anfärbung durchgeführt.



T1SS (10µg)
IEF-Eichkit pH 2.5-6.5
Rohextrakt a. R. serpentina
Meerrettichperoxidase (5µg)

Abb. 51 Anfärbung der Kohlenhydratanteile durch Schiff's - Reagenz nach isoelektrischer Fokussierung (vgl. S.43)

Als Kontrollprotein für die Färbeprozedur und ihre Sensitivität ist Meerrettich-Peroxidase, die ebenfalls ein Glykoprotein ist, in einer Spur aufgetragen.

Die Spur mit gefrieretrocknetem Rohextrakt aus R. serpentina zeigt, daß eine Vielzahl glykosilierter Proteine in der löslichen Proteinfraktion vorliegt.

5.10.2 Anthron - Reaktion

Mit Hilfe der Anthron-Reaktion wurde der Kohlenhydratanteil von TiSS quantifiziert.

Zur Analyse wurde eine Eichgerade mit Glucoseoxidase aufgestellt, die einen Kohlenhydratanteil von 16.2 % hat, davon 2.0 % Aminosucker. Da mit dem Anthrontest Hexosamine nicht erfaßbar sind, wurde für die Eichgerade ein Zuckeranteil von 14.2 % zu Grunde gelegt.

Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des Coomassietests bestimmt.

Peroxidase, ebenfalls ein Glykoprotein, diente zur Überprüfung der Eichung.

Der Kohlenhydratanteil von TiSS (ohne Hexosamine) wurde zu 5.6% bestimmt.

5.10.3 Gaschromatographischer Nachweis der Zuckerkomponenten

Basierend auf dem Ergebnis des Anthron-Tests konnte berechnet werden, daß für die gaschromatographische Analyse der Zucker mindestens 1 mg Protein nötig ist.

Nach Hydrolyse und Derivatisierung (vgl. Seite 45) wurden 50 % der Substanz direkt gaschromatographisch aufgetrennt. Den verbliebenen 50 % wurde ein Zuckerderivatgemisch als interner Standard zugesetzt und dann ebenfalls mit Gaschromatographie analysiert. Durch Vergleich der Profile können die Zucker identifiziert und durch Auswertung der Flächenänderung der Peaks quantifiziert werden.

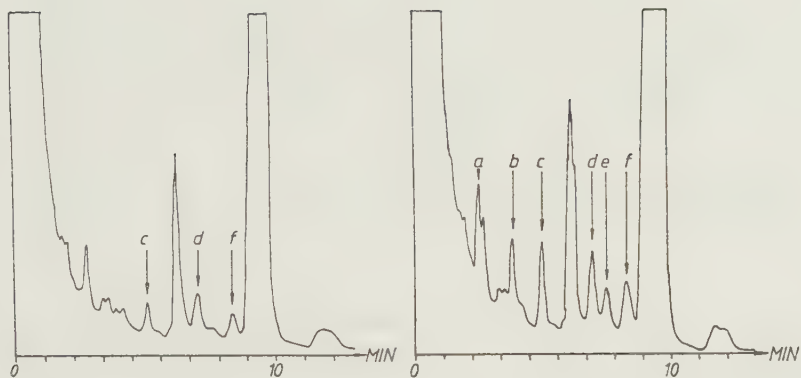


Abb. 52 a

Abb. 52 b

Abb. 52 Gaschromatographische Kohlenhydratanalyse ohne (a) und mit internem Standard (b)

Zuordnung der Peaks

a) Rhamnose	c) Xylose	e) Galaktose
b) Arabinose	d) Mannose	f) Glucose

Die Auswertung ergibt folgende Kohlenhydratanteile:

Xylose	1.1 %
Mannose	2.6 %
Glucose	1.6 %
	5.3 %

Der Gesamtkohlenhydratanteil ohne Hexosamine ist 5.3 % .

5.10.4 Nachweis von Aminosuckern

Aminosucker können zusammen mit den Aminosäuren analysiert werden. In Abbildung 50 sind vor Tyrosin zwei kleine Peaks und zwischen Tyrosin und Phenylalanin ein weiterer Peak zu erkennen.

Erstere konnten nicht zugeordnet werden, letzterer wurde als Glucosamin identifiziert.

5.11 Enzymtoleranz

Für den technischen Einsatz kann es von Bedeutung sein, geringe Mengen wassermischbarer Lösungsmittel enzymkatalysierten Reaktionen zusetzen zu können, um beispielsweise Substrate leichter in Lösung zu bringen, oder Produkte zu stabilisieren.

Das Produkt der Strictosidinsynthese, das Cathenamin, ist ein Beispiel für die beschriebene Problemstellung.

Für die Strictosidinsynthese wurde die Toleranz der Enzymaktivität gegenüber den folgenden sieben Reagenzien im Standardtest ermittelt.

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Polyethylenglykol 6000 (PEG)
Dimethylformamid (DMF)	Natriumdodecylsulfat (SDS)
Essigsäureethylester (EEE)	Aceton
Ethanol	

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Volumenanteil des Hilfsstoffes ist in Abbildung 53 dargestellt.

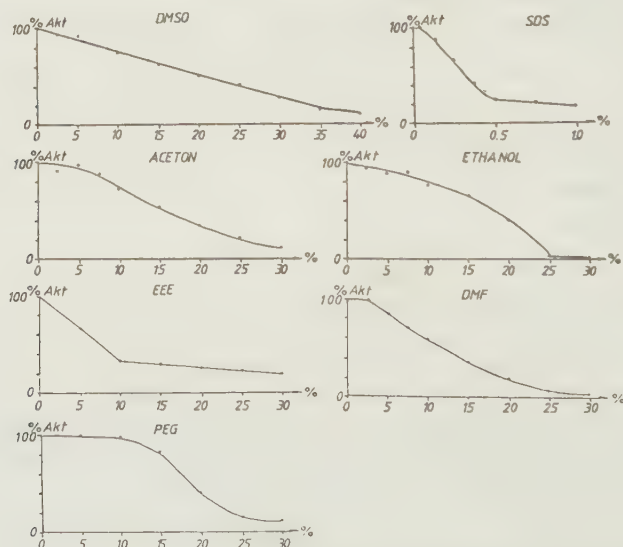


Abb. 53 Enzymtoleranz der Strictosidinsynthese gegenüber einigen biochemischen Hilfsstoffen

Je 40 pkat Enzymaktivität pro Ansatz (entspr. 100 %)

6. Immobilisierung der Strictosidinsynthese

Die Möglichkeit, ein Enzym mit guter Aktivitätsausbeute an eine feste Phase ankoppeln zu können, ist für den präparativen Einsatz von großer Bedeutung, da es in der Reaktion nicht verloren geht und nicht aus dem Produkt abgetrennt werden muß. Die Synthaseaktivität aus C. roseus wurde bereits erfolgreich von PFITZNER (1984) immobilisiert.

Für die Strictosidinsynthese aus R. serpentina mußte überprüft werden, ob diese Technik bei diesem Enzym mit ähnlichem Erfolg eingesetzt werden kann.

6.1 Vergleich verschiedener Immobilisierungstechniken

Strictosidinsynthese aus R. serpentina wurde an die in Tab. 10 zusammengefaßten Materialien, wie auf Seite 47 beschrieben, gekoppelt.

Die erzielten Aktivitätsausbeuten wurden mit einem Aliquot der Gelsuspensionen im Standardtest bestimmt.

Da das Trägermaterial rasch sedimentiert, müssen die Testansätze während der Inkubationszeit ständig moderat geschüttelt werden, um eine gleichmäßige Verteilung des immobilisierten Enzyms zu gewährleisten. Wird dies außer Acht gelassen, ermittelt man zu niedrige Aktivitätsausbeuten, da die Umsatzgeschwindigkeit von immobilisiertem Enzym am Boden des Sediments durch die notwendige Diffusion der Substratmoleküle durch die oberen Schichten limitiert wird.

Adsorbens	Aktivitätsausbeute
CNBr-aktivierte Sepharose 4B	38 %
Epoxyaktivierte Sepharose 6B	31 %
Hydroxysuccinimidyl=SP500	18 %
Controlled-Pore Glass	5 %

Tab. 10 Aktivitätsausbeute bei Immobilisierung der Strictosidinsynthese an verschiedenen Trägern

Der Standardtest wurde deshalb nicht wie üblich in 1.5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt, sondern in 96-Well Immunoassay-platten. Die vortemperierten Platten wurden nach Einpipettieren der Testlösungen mit einer Lage Parafilm und einem Deckel dicht verschlossen und während der Inkubationszeit in einem Brutschrank bei 37°C auf einem geeigneten Schüttler(1) bei 120 Upm bewegt.

6.2 Stabilität an CNBr-aktivierter Sepharose immobilisierten Enzyms

Homogenes Enzym wurde an CNBr-aktivierter Sepharose immobilisiert, in Aliquots bei verschiedenen Temperaturen unter Zusatz von 0.02 % Natriumazid gelagert und deren Aktivität, wie oben beschrieben, regelmäßig getestet.

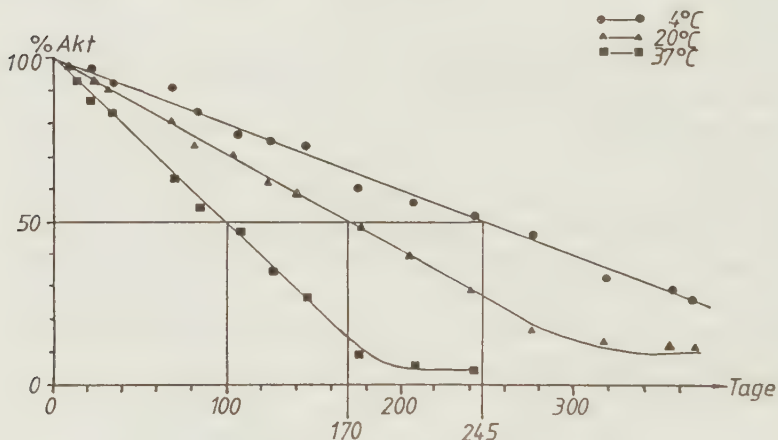


Abb. 54 Aktivitätsabnahme immobilisierten Enzyms bei verschiedenen Lagerungstemperaturen

Die Proben hatten zu Beginn der Messungen einheitlich 110 pkat Enzymaktivität (entspr. 100 %)

In Tabelle 11 sind die ermittelten Halbwertszeiten den entsprechenden Werten gereinigten löslichen Enzyms gegenübergestellt (vgl. Seite 167).

(1) z.B. IKA-Werk, Staufen: IKA Mikrotiter MTS

Temperatur	lösl.Enzym	immob.Enzym
37°C	36 d	100 d
20°C	80 d	170 d
4°C	295 d	245 d

Tab. 11 Halbwertszeiten der Enzymaktivität von löslicher und immobilisierter, homogener Strictosidinsynthese bei verschiedenen Lagerungstemperaturen

Immobilisiertes Enzym ist bei 37°C etwa dreimal stabiler als lösliche Strictosidinsynthese.

Strictosidinsynthese aus R. serpentina ist sowohl in löslicher, wie auch in immobilisierter Form stabiler als die entsprechenden Enzyme aus C. roseus (PFITZNER (1984)).

Besonders deutlich ist der Unterschied bei löslichem Enzym; 5 h Halbwertszeit bei 37°C für das Enzym aus C. roseus, 36 d für das Enzym aus R. serpentina bei gleichen Bedingungen.

6.3 Produktion von Strictosidin

Zur Strictosidinproduktion wurden durch eine Säule immobilisierter Strictosidinsynthese mit einer Gesamtaktivität von 25 nkat die Substrate Tryptamin und Secologanin in äquimolaren Lösungen, jeweils 9 mM, mit 0.11 ml/min pro Substrat gepumpt. Beide Substrate waren in Wasser gelöst und auf pH = 6.5 eingestellt worden.

Das Eluat der Säule enthält das gebildete Strictosidin.

Die Pumprate läßt sich wie folgt berechnen:

- A = Aktivität der Säule (nkat)
 K = Konzentration der Substrate (mmol/l)
 S = Sicherheitsfaktor
 (z.B. 2 bedeutet, daß für die Berechnung der Flußrate nur die halbe Aktivität vorausgesetzt wird)
 F = Flußrate pro Substrat (ml/min)

$$F \text{ (ml/min)} = \frac{A}{S \times K} \times \frac{60}{1000}$$

Die Säule wird in einem Wasserbad auf 37°C temperiert, Substrate und Produkt befinden sich in einem Eisbad.

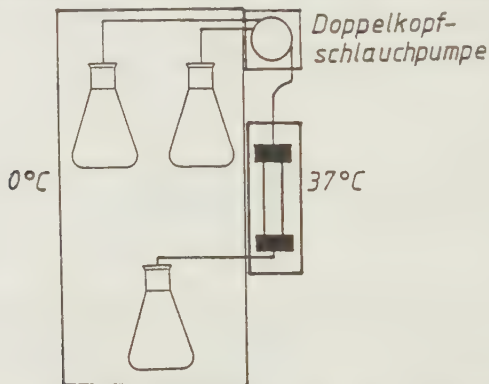


Abb. 55 Schema des Versuchsaufbaus zur Erzeugung von Strictosidin mit immobilisierter Synthase

Substratkonzentrationen : 9 mM Tryptamin
 9 mM Secologanin
Pumprate : 0,1 ml/min
Enzymaktivität der Säule: 25 nkat

Die Auffanggefäße des Säuleneluates wurden alle 12 h gewechselt und der Inhalt gefriergetrocknet.

In sechstägigem Dauerbetrieb wurden 5 g Strictosidin hergestellt.

6.4 Identität und Reinheit des Produktes

Die Identität und Reinheit des Produktes wurde durch dünn-schichtchromatographische Analyse an Hand von Referenzsubstanzen von Fr. Dr. U. Pfitzner überprüft, die das Produkt bereits eingehend charakterisiert hatte (PFITZNER (1984)).

Eine Probe des Lyophilisats, Tryptamin, Secologanin und Referenzsubstanz Strictosidin wurden in drei Laufmittelsystemen auf Kieselgelplatten(1) chromatographiert und unter UV-Licht detektiert.

LM 1	Aceton : Methanol	: Diethylamin = 70 : 10 : 10
LM 2	Aceton : Chloroform	: Wasser = 80 : 20 : 5
LM 3	Petrolether : Aceton	: Diethylamin = 70 : 20 : 10

(1) MACHEREY & NAGEL, Polygram Sil G/UV254

In allen Laufmittelsystemen lief die Probe auf gleicher Höhe mit Strictosidin und zeigte in der UV-Detektion nur eine Bande.

Projektierung

Strictosidinsynthese ist, wie schon in der Einleitung ausführlich dargestellt wurde, von großem pharmakologischem Interesse.

Die chemische Synthese des Strictosidins ist wirtschaftlich nicht möglich. Die enzymkatalysierte Synthese stellt den einzigen momentan gangbaren Weg dar.

Strictosidinsynthese aus R. serpentina ist auf Grund ihrer Stabilität und Immobilisierbarkeit für den präparativen Einsatz gut geeignet.

Limitierend ist bis jetzt die Verfügbarkeit dieses Proteins.

Durch die Gentechnologie wurden neue Wege aufgezeigt, Proteine durch Expression in einem prokaryontischen Wirtsorganismus in essentiellen Mengen zu gewinnen.

Prokaryonten besitzen jedoch kein Glykosilierungssystem für Proteine. Da durch Perjodatspaltung des Kohlenhydratanteils der Strictosidinsynthese gezeigt werden konnte, daß er für die enzymatische Aktivität nicht essentiell ist, besteht eine realistische Chance, daß eine in einem Prokaryonten synthetisierte Strictosidinsynthese auch ohne Zuckerkomponenten enzymatisch aktiv ist.

Die Klonierung des Strictosidinsynthasegens ist der Schlüssel zu nahezu unbegrenzten Mengen dieses interessanten Enzyms.

Die Isolierung und Charakterisierung der Strictosidinsynthese bilden die Grundlage, um dieses Ziel angehen zu können.

Die Eigenschaften und die Bedeutung der Strictosidinsynthese rechtfertigen diese Bestrebungen.

7. Aminosäuresequenzanalyse

Um ausgehend von einem isolierten Protein das zugehörige Gen finden zu können, muß mindestens ein Teil seiner Aminosäuresequenz ermittelt werden, um Oligonukleotide, als spezifische Hybridisierungsprobe für die zugehörige DNA, ableiten zu können.

7.1 Blockierung des Aminoterminus

Eine Sequenzanalyse des Aminoendes der Strictosidinsynthase scheiterte trotz mehrerer Versuche mit Proteinmengen von 3 - 20 nmol. Es muß daraus geschlossen werden, daß der Aminoterminus für Edman-Abbau nicht zugänglich ist, also eine Blockierung vorliegt.

Ich danke Frau Dr. Wittmann-Liebold, Max Plank Institut für Molekulare Genetik, Berlin, für die Durchführung der Sequenzierungsversuche.

7.2 Präparation von Peptiden

Da eine Sequenzierung vom Aminoende her nicht möglich war, blieb nur die wesentlich aufwendigere und zeitraubendere Alternative, nach Proteinspaltung Fragmente zu isolieren und diese zu sequenzieren.

7.2.1 Tryptische Spaltung

Zur Proteinspaltung wurde TPCK behandeltes Trypsin verwendet. Durch die Behandlung mit N-Tosyl-L-phenylalanyl-chlormethan werden nicht abgetrennte Chymotrypsinaktivitäten inhibiert. Die Spaltungen wurden nach der Vorschrift auf S.50 durchgeführt.

7.2.2 Isolierung einzelner Peptide

Die Isolierung einzelner Peptide erfolgte durch Reversed-Phase HPLC, wie auf Seite 51 beschrieben. Sehr gute Trennungen konnten mit den Säulen BAKER, BakerBond RP8 und RP4 erzielt werden. Die RP8 - Säule eignet sich besser zur Isolierung der längeren,

lipophilen Peptide, RP4 löst die kürzeren besonders gut auf. Die in den Abbildungen 56 und 57 dargestellten Elutionsprofile des Peptidmusters einer tryptischen Spaltung der Strictosidin-synthase aus R. serpentina mit beiden Säulentypen verdeutlichen dies.

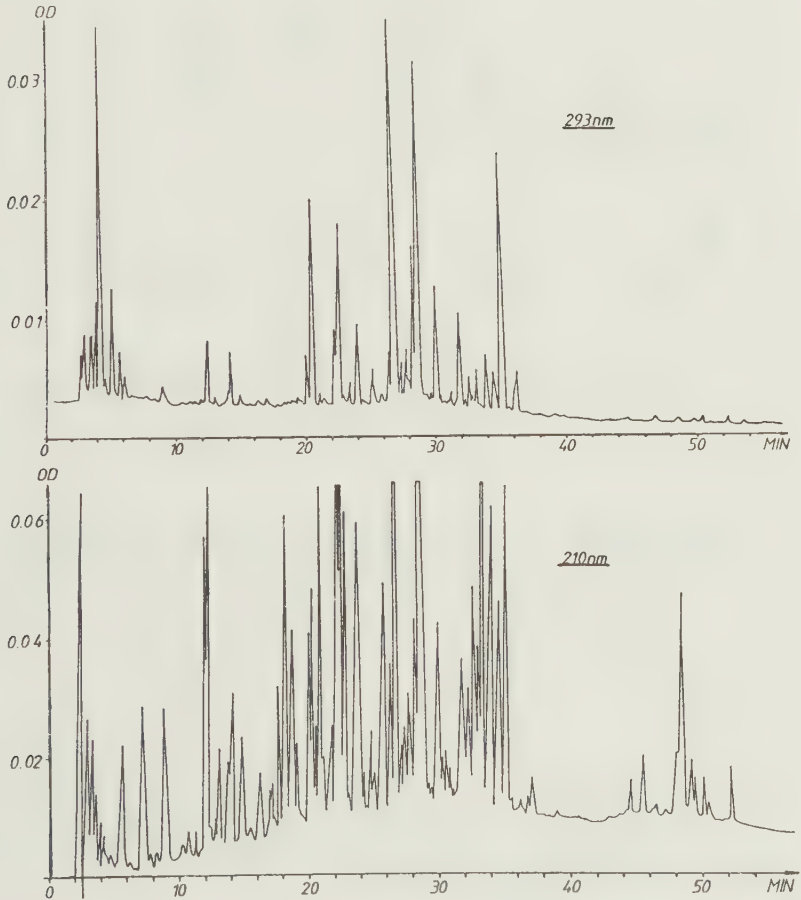


Abb. 56 Elutionsprofile von je 2 nmol Peptidgemisch einer Trypsinspaltung von TiSS, detektiert bei 210 nm u. 293 nm, bei Trennung mit einer RP8-Säule

Fluß	: 1 ml/min	Injektionsvolumen	: 50 µl
Gradient	: 1 %/min		
Komp. A	: 0.1 % TFA	Komp. B	: 0.1 % TFA
			60 % Acetonitril

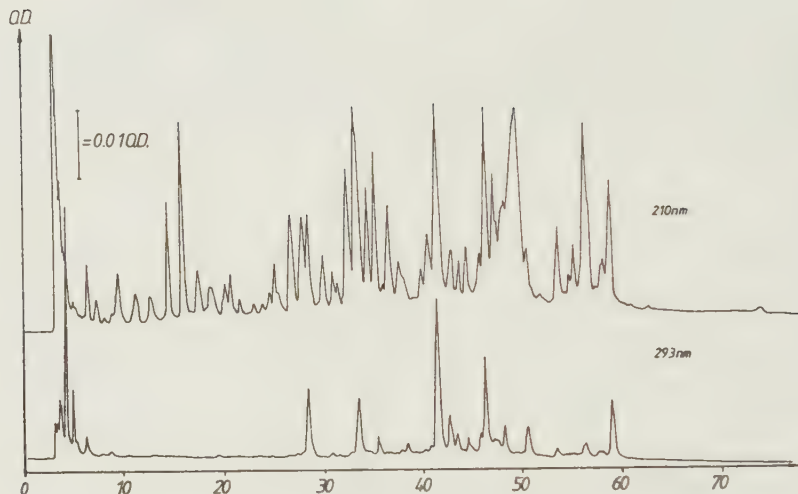


Abb. 57 Trennung von je 2 nmol tryptischer Peptide
von TiSS mit einer RP4 - Säule
Fluß : 1 ml/min Injektionsvolumen : 50 μ l
Komp. A : 0.1 % TFA Komp. B : 0.1 % TFA
60 % Acetonitril
Gradient : 0.5 %/min

Die Detektion bei 293 nm ermöglicht, Tryptophan-haltige Peptide zu identifizieren, die für die Synthese von Oligonukleotiden besonders interessant sind, da Tryptophan nur ein Basentriplett im genetischen Code besitzt.

Tyrosin und Phenylalanin haben bei dieser Wellenlänge nur 1/10 der Absorption von Tryptophan.

Die Detektion bei 293 nm ermöglicht außerdem eine sensitive und schnelle Überprüfung der Äquivalenz verschiedener Spaltungen eines Proteins mit dem gleichen Enzym, da sich die Zahl der Peaks auf einige wenige, die ohne technische Hilfsmittel identifiziert werden können, reduziert.

Die Erfahrung hat nämlich gezeigt, daß die Spaltungsmuster eines Proteins, selbst bei Verwendung der gleichen Reagenzien, sehr sensitiv auch auf geringe Änderungen der Versuchsbedingungen reagieren. Erst nach mehreren Anläufen waren die Parameter

gefunden, die zu reproduzierbaren Elutionsmustern, häufig auch als "fingerprints" bezeichnet, führten.

Die absolute Reproduzierbarkeit der Proteinspaltung ist eine unabdingbare Voraussetzung, um die Ergebnisse der Sequenzanalyse überprüfen zu können. Eine Sequenz kann als gesichert betrachtet werden, wenn das gleiche Peptid aus einer separaten Spaltung einer anderen Präparation des Enzyms isoliert und analysiert worden ist.

Angeichts der weitreichenden Konsequenzen von Fehlern bei der Sequenzanalyse scheint der Aufwand gerechtfertigt.

Alle im nächsten Abschnitt angegebenen Teilsequenzen sind mindestens zweimal analysiert worden und können als gesichert angesehen werden.

7.3 Sequenzanalyse isolierter Peptide

Die Sequenzanalyse wurde mit einem Gasphasensequenciator und nachfolgender Analyse der PTH-Aminosäuren, wie auf Seite 51 und 52 beschrieben, durchgeführt.

In Tabelle 12 sind die ermittelten gesicherten Teilsequenzen der Strictosidinsynthese aus R. serpentina zusammengestellt.

P1 :	Asn - Ala - Asp - Gly - His - Phe - Pro
P2 :	Trp - Leu - Tyr - Ala - Val - Thr - Val - - Asp - Gln - Leu
P3 :	Tyr - Trp - Leu - Glu - Gly
P4 :	Tyr - Glu - Gly - Pro - Asn - Ser - Gly - - Phe - Val - Asp - Phe - Ala - Tyr - Ala - - Ser - Pro - Tyr
P5 :	Gly - Val - Gln - Gln - Ile - Met - Asp - - Thr - Ser - Asp - Lys

Tab. 12 Reproduzierte Teilsequenzen der Strictosidin-synthese aus R. serpentina

8. Oligonukleotide als Hybridisierungs-Probe

Oligonukleotide können als vielfältiges Werkzeug zur Detektion von RNA und DNA dienen.

Die Sequenz einer Oligoprobe wurde aus einer bekannten Aminosäuresequenz nach folgendem Schema abgeleitet.

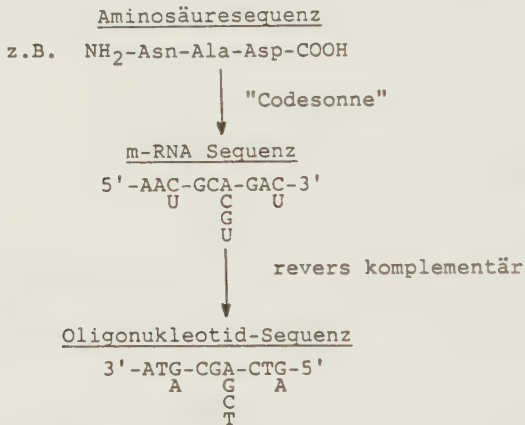
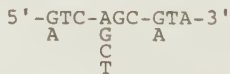


Abb. 58 Ableitung der Sequenz einer Oligonukleotidprobe zu einer vorgegebenen Aminosäuresequenz

Zum Peptid Asn-Ala-Asp leitet sich nach dem obigen Schema also folgendes Oligonukleotidgemisch ab:



Ein so konstruiertes Oligonukleotidgemisch ist sowohl zur Hybridisierung mit m-RNA als auch mit dem nicht codogenen DNA-Strang befähigt, also universell verwendbar.

Abbildung 58 stellt den Zusammenhang zwischen Proteinsequenz und Oligonukleotidsequenz dar; Abbildung 59 verdeutlicht die für die Hybridisierungen maßgebenden Sequenzhomologien zwischen der DNA-Sequenz und der Oligonukleotidprobe.

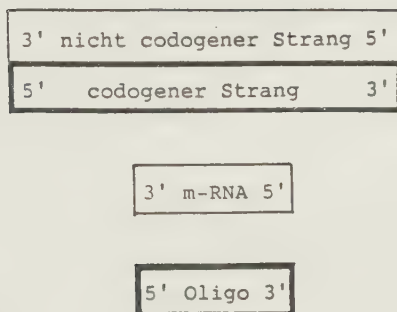


Abb. 59 Sequenzhomologien zwischen den Oligonukleotiden, der m-RNA und den beiden DNA-Strängen

Der codogene Strang ist also homolog zur Oligonukleotidprobe, der nicht codierende Strang und die m-RNA sind revers komplementär zu dessen Sequenz und somit zur Hybridisierung befähigt.

8.1 Auswahlkriterien für geeignete Aminosäuresequenzen

Aus den bekannten Aminosäuresequenzen können Bereiche, die für eine Ableitung von Oligonukleotiden besonders geeignet sind, nach folgenden Kriterien ausgewählt werden:

1) Niedrige Degeneration

Arginin, Serin und Leucin sind wegen ihrer hohen Degeneration (6-fach) besonders ungünstig für Oligonukleotide.

Aus technischen Gründen sind Oligonukleotidgemische aus mehr als 128 Einzelsträngen nicht zuverlässig synthetisierbar. Um in einer Synthese alle Möglichkeiten erfassen zu können, ist es vorteilhaft, von Aminosäuren mit nur wenigen Codons ausgehen zu können. Die Degenerationen der Tripletts, die den einzelnen Aminosäuren entsprechen, multiplizieren sich zur Gesamtdegeneration eines Gemisches.

2) Hohe Basenzahl

Je mehr Basen ein Oligonukleotid enthält, um so selektiver ist es.

Theoretisch kommt ein 14-mer Oligonukleotid nur einmal in einem Genom von der Größe des Menschen (9×10^6 kb) vor.

3) Hoher G/C - Gehalt

Die Schmelztemperatur eines Oligos, die Temperatur, bei der die Wasserstoffbrücken zu seinem komplementären Strang nicht mehr ausreichen es weiter zu binden, sollte möglichst hoch sein, um unspezifische Reaktionen und Kreuzreaktionen minimieren zu können.

Die Schmelztemperatur läßt sich überschlagsweise so berechnen:

pro G/C - Paar	4°C
pro A/T - Paar	2°C

Summiert man über das gesamte Oligonukleotid auf, erhält man näherungsweise die Schmelztemperatur.

4) Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym

Enthalten alle Oligonukleotide eines Gemisches, oder zumindest Gruppen davon, die Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym (in Frage kommen nur sogenannte 4-er Enzyme) kann sehr einfach getestet werden, ob ein positives Signal auf einer spezifischen Hybridisierung beruht. Wird die getestete DNA mit dem Restriktionsenzym geschnitten, muß das Signal verschwinden.

Werden die Oligos für RNA-Hybridisierungen eingesetzt, ist dieser Punkt ohne Bedeutung.

Die vorliegenden Aminosäuresequenzen sollten nach obigen Kriterien in der angeführten Reihenfolge nach geeigneten Sequenzen gesichtet werden.

Folgende Oligonukleotidproben wurden verwendet:

HA1 : Tyr - Trp - Leu - Glu - Gly

5'- CC - TTC - AAG - CCA - ATA -3'
 C C A G
 T
 G

14 - mer / 32-fache Degeneration

Asn - Ala - Asp - Gly - His - Phe - Pro
 HA4 : 5'- GG - GAA - GTG - GCC - GTC - CGC - ATT -3'
 A A A T G

HA5 : 5'- G -3'
 A

20 - mer / 32-fache Degeneration

In Position 9 (unterstrichenes G) wurde, um die Degeneration der Gemische niedrig zu halten, statt aller 4 Nukleotide nur G eingesetzt.

G paart mit C und, wenn auch schlecht, mit T. Die Wahrscheinlichkeit, keinen "mismatch" zu haben, ist also 50%.

Die Oligonukleotidgemische wurden über einen Zeitraum von einem Jahr verteilt synthetisiert und entsprachen dem jeweiligen Stand an gesicherten Aminosäuresequenzen.

8.2 Reinigung der Oligonukleotide

Für Hybridisierungsexperimente müssen die Oligoproben gereinigt und mit ³²P-ATP markiert werden.

Zur Reinigung der Oligonukleotide von abgespaltenen Schutzgruppen und Bruchstücken der DNA-Synthese eignet sich ein 16 % Polyacrylamid / 8 M Harnstoff - Gel.

Nach visueller Detektion der Oligonukleotide können sie durch Diffusion aus dem Gel eluiert und mit einer kleinen Ionenaustauschersäule von Harnstoff befreit und konzentriert werden. Dieses Verfahren ist im Detail auf den Seiten 53 ff beschrieben.

Kapazität des Reinigungsganges

Das rohe Syntheseprodukt der Oligonukleotidsynthese löst man dazu in Wasser zu einer Konzentration von 2 nmol/ μ l. 25 μ l davon, das entspricht 50 nmol, können mit einem Gel gereinigt werden.

Diese Menge ist, selbst bei größeren Verlusten bei der Reinigung, ausreichend für mindestens 1000 Hybridisierungsexperimente.

Konzentration der Lösungen der gereinigten Oligonukleotide

Die Konzentrationen der gewonnen Oligonukleotidlösungen lagen bei allen Reinigungen zwischen 0.08 μ g/ μ l und 1.5 μ g/ μ l.

In die Kinasierungsreaktion von Oligo-Proben für ein Hybridisierungsexperiment müssen 1 - 2 μ l dieser Lösungen eingesetzt werden, was noch gut zu pipettieren ist. Es empfiehlt sich, konzentriertere Lösungen zu verdünnen.

Ausbeute

Die eingesetzten 50 nmol Oligonukleotid entsprechen, bei einer Probe mit einer Länge von 20 Basen, 300 μ g Rohsubstanz. Nach Trennung, Eluieren und Konzentrieren wurde jeweils etwa 100 μ g gereinigtes Oligonukleotidgemisch erhalten.

Die mit dieser Methode erzielten Ausbeuten liegen also bei circa 30 %, was angesichts der zur Verfügung stehenden Materialmengen, es wurde nur 1/20 des Syntheserohproduktes eingesetzt, ausreichend ist.

8.3 Markierung mit ^{32}P -dATP

Die Kinasierungsreaktionen dienen zum Markieren des 5'-Endes der DNA-Probe mit ^{32}P -Phosphat.

Ein 50%-iger Überschuß an γ - ^{32}P -dATP (15 pmol Oligonukleotid zu 21 pmol dATP) und hohe Konzentrationen an T4-Polynukleotidkinase (2U/pmol Oligonukleotid) haben sich als optimal erwiesen. Diese Bedingungen weichen von den Angaben in bekannten Labormanualen wie MANIATIS et.al (1982) ab.

Durch Trennen von nicht umgesetztem dATP und markiertem Oligonukleotid durch Gelfiltration an Sephadex G 25 (Arbeitsanleitung siehe Seite 82 ff) konnte gezeigt werden, daß mehr als 90% der eingesetzten Oligonukleotide markiert waren, während mit den Bedingungen nach MANIATIS et.al. (1982) nur eine Markierungsrate von 60 % erreicht wurde.

	Bedingungen	Markierungsrate
MANIATIS <u>et.al.</u> (1982)	dATP : Oligo = 1 : 1 0.4 U T4-Kin./pmol Oligo	60 %
Überschußkinasierung	dATP : Oligo = 1.5 : 1 2 U T4-Kin./pmol Oligo	90 %

Tab. 13 Markierungsraten bei der Kinasierung von Oligonukleotiden unter Überschuß- und äquimolaren Reaktionsbedingungen

Für die Sensitivität der Hybridisierungen ist die Markierungsrate der eingesetzten DNA-Sonde von großer Bedeutung. Markierte und unmarkierte Oligonukleotide konkurrieren um die gleichen Hybridisierungsstellen, jedoch nur die radioaktiven tragen zur Filmschwärzung und damit zum Signal bei.

Abtrennen von nicht umgesetztem radioaktivem dATP

Die Überschußkinasierung bringt es mit sich, daß generell ein Teil des eingesetzten dATP's nach Ende der Reaktion unverändert in der Probe vorliegt.

Dieser Anteil könnte, ähnlich wie bei einer "Nick-translation", mit Gelfiltration entfernt werden.

Eine Abtrennung des nicht verbrauchten dATP's ist jedoch nicht nötig. Es konnte gezeigt werden, daß durch Zusatz von 1 mM "kaltem" dATP zu den Hybridisierungslösungen eine Erhöhung des Signalhintergrundes vollständig vermieden werden kann (vgl. Seite 83, Hybridisierungslösungen).

Weit über hundert Hybridisierungen, inklusiv denen zu allen in dieser Arbeit abgebildeten Autoradiogrammen, wurden nach der beschriebenen Methode (Arbeitsanleitung siehe Seite 83 ff) durchgeführt.

Die Strategie der gewählten Methoden, ihre Vor- und Nachteile im Hinblick auf die Klonierung von prozessierten Proteinen des Sekundärmetabolismus aus pflanzlichen Zellkulturen, sollen hier kurz dargestellt werden. Die Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln im einzelnen diskutiert.

9.1 c-DNA Synthese

In Abbildung 61 ist der Ablauf einer Klonierung über c-DNA skizziert.

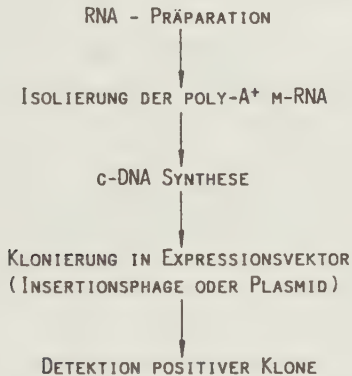


Abb. 61 Flußdiagramm für die c-DNA Klonierung

Vorteile

Selektive Isolierungsmethode durch poly-A Sequenz der m-RNA

Eukaryotische m-RNA hat einen 100 - 200 Basen langen poly-A Schwanz. Dieser ermöglicht die sehr spezifische Abtrennung von m-RNA aus der Gesamt-RNA durch Affinitätschromatographie an oligo-dT-Cellulose.

Abwesenheit aller Introns

Eukaryotische Gene sind häufig von Introns unterbrochen. Diese Regionen tauchen in der reifen m-RNA nicht mehr auf.

Repetitive Sequenzen und die absolute Genomgröße spielen keine Rolle

Pflanzengenome können bis zu 100-mal größer sein als das Menschengenom, bestehen aber zu etwa 85% aus repetitiven, nicht codierenden Regionen (MURRAY et.al. (1978)). Da diese Bereiche nicht transkribiert werden, sind sie für die m-RNA Isolierung ohne Bedeutung.

Möglichkeit, sowohl mit Antikörpern als auch mit Oligonukleotiden zu detektieren

Von allen gereinigten Proteinen sind Antiseren leicht zu gewinnen.

Sequenzinformationen erfordern wesentlich mehr Zeit- und Arbeitsaufwand. Wenn das Protein am Aminoterminal nicht für Edman-Abbau zugänglich ist, dann bleibt nur der Weg über Proteinspaltung, Peptidisolierung und anschließender Sequenzierung (wie in dieser Arbeit durchgeführt), was voraussetzt, daß eine Methode erarbeitet ist, die es erlaubt, die notwendigen Mengen (circa 20 nmol) homogenen Proteins zu präparieren.

Nachteile

Kopienzahl der m-RNA von Sekundärstoffwechselenzymen

Die Kopienzahl ist für die untersuchte Pflanzenfamilie nicht bekannt. Es ist jedoch zu erwarten, daß die m-RNA von Sekundärstoffwechselenzymen zu den seltenen m-RNA's gehört. Als seltene m-RNA's gelten, deren Kopienzahl pro Zelle zwischen 1 und 10 liegt.

Induzierbarkeit der m-RNA

Eine Induzierbarkeit des Proteins und damit der m-RNA konnte nicht erreicht werden und ist auch für andere Proteine der Indolalkaloidbiosynthese nicht bekannt. Da die Zellen einer Suspensionskultur nicht synchronisiert sind, werden für die m-RNA Isolierung zwangsläufig viele Zellen mit verwendet, die zwar m-RNA's der Proteine des Primärstoffwechsels enthalten, aber keine Kopien der gesuchten m-RNA. Auf Grund dieser Statistik sinkt der effek-

tive RNA Gehalt an spezifischer m-RNA wahrscheinlich auf unter 1 Kopie pro Zelle.

Kapazität der Anreicherungsverfahren

Pflanzenzellen bestehen zu mehr als 90 % aus Wasser. Um die nötigen Mengen m-RNA isolieren zu können, damit auch seltene Spezies in ausreichender Quantität enthalten sind, müssen Gewebemengen aufgearbeitet werden, die speziell bei den immer nötigen Cäsiumchloridzentrifugationsschritten die Kapazität auch großer Rotoren für die Ultrazentrifugation (z.B. Beckman, SW25.2) übersteigen.

Lebensdauer der m-RNA / Effizienz der poly-A Selektion

Neben den bekannten Problemen mit den sehr stabilen RNasen, die aber durch besonders sorgfältiges Arbeiten gelöst werden können, bringt die Selektion durch Chromatographie an oligo-dT-Cellulose ein anderes Problem mit sich. Untersuchungen haben zu der Vermutung geführt, daß die Länge der poly-A Region von m-RNA mit deren Alter korreliert ist (GIERSON (1982)). Junge m-RNA hat lange, ältere kürzere poly-A Bereiche. Auch unprozessierte m-RNA ist bereits polyadenyliert und hat noch die volle Länge der poly-A Region. Mit oligo-dT-Cellulose kann aber nur die m-RNA mit langen poly-A Schwänzen isoliert werden, gealterte m-RNA läuft durch. Diese beiden Fraktionen bezeichnet man als poly-A⁻ und poly-A⁺. Die isolierte m-RNA ist also ein Gemisch prozessierter und unprozessierter m-RNA und enthält nur mit geringer Ausbeute reife m-RNA, die bereits an Polysomen assoziiert ist, da diese der poly-A⁻ - Fraktion zuzuordnen ist. Von den wenigen Kopien, die pro Zelle vorliegen, ist nur ein bestimmter, nicht kalkulierbarer Prozentsatz mit der genannten Methode isolierbar.

Bei der Isolierung einer "seltenen" m-RNA aus nicht synchronisierten Zellen einer Suspensionskultur ist aus den oben genannten Gründen mit großen Schwierigkeiten zu rechnen.

9.2 Genomische Genbanken in Lambda-Phagen

In Abbildung 62 ist schematisch die Vorgehensweise der Klonierung über genomische Genbanken skizziert.

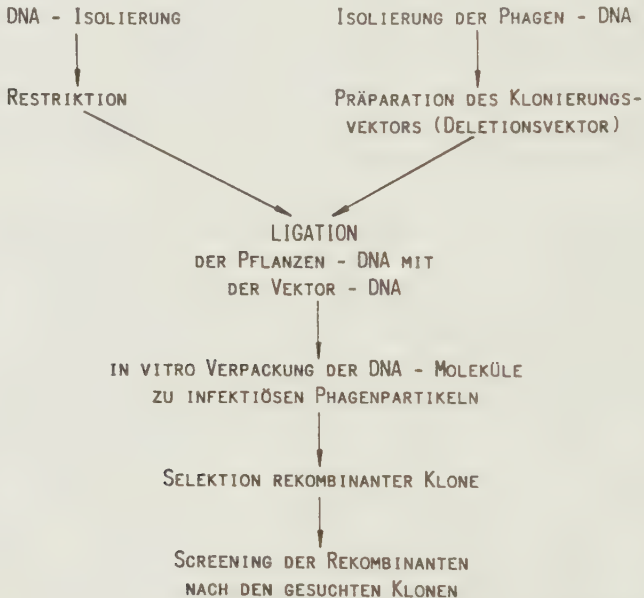


Abb. 62 Flußdiagramm für die Klonierung mit Lambda-Phagen

Vorteile

DNA-Gehalt von Pflanzenzellen

Pflanzenzellen haben vergleichsweise hohen DNA-Gehalt (ca 12 pg / Zelle gegenüber 0.004 pg / Zelle bei E. coli (GIERSON (1984))).

DNA ist leicht zu präparieren

Die Isolierung auch größerer Mengen DNA ist relativ leicht zu bewältigen. Die spezifischen Probleme im Umgang mit m-RNA, wie RNasen und Instabilität, sind für DNA ohne Bedeutung. DNasen können effizient inhibiert werden.

Nachteile

Keine Selektion zwischen codierenden und nicht codierenden Regionen

Bei den Restriktionen und Ligationen bietet sich keine Möglichkeit, zwischen codierenden DNA-Bereichen und nicht-codierenden zu unterscheiden.

Genomgröße sehr schwierig abzudecken

Direkte Konsequenz aus dem obengenannten Problem ist, daß zur Repräsentation eines Pflanzengenoms eine sehr große Zahl von Einzelklonen nötig ist (für die Berechnung vgl. MANIATIS et.al. (1982)).

Deshalb ist es wichtig, Vektoren zu verwenden, die Vehikel für möglichst große Fragmente Fremd-DNA sein können.

Nur Oligonukleotide sind für die Selektion einsetzbar

Da Vektoren, die Fremd-DNA-Fragmente von circa 20 kb tragen, verwendet werden müssen, ist ein Test auf Expression faktisch nicht möglich. Nur der kurze DNA-Bereich der direkt hinter der Klonierungsstelle liegt, wird von der bakteriellen Polymerase transkribiert (Fusionsproteine). Die klonierte Pflanzen-DNA enthält selbst keine Bindungsstellen für bakterielle Polymerase. Außerdem sind alle Introns mit kloniert und Bakterien besitzen kein "Splicing"-System.

9.3 Detektionssysteme

Prinzipiell stehen Antikörper und Oligonukleotide zur Verfügung und wurden beide schon erfolgreich für die Detektion klonierter DNA eingesetzt. Verschiedene Gründe, die kurz dargestellt werden sollen, haben zu dem Schluß geführt, daß ein immunologisches Detektionssystem für die vorliegende Problemstellung faktisch inpraktikabel ist.

9.3.1 Detektion nach c-DNA Klonierung

Antikörper können erst auf der Expressionsebene eingesetzt werden. Die gesamte m-RNA Isolierung, c-DNA Synthese und

Klonierung in einen Expressionsvektor ist mit Antikörpern auf keiner Stufe überprüfbar.

Dazu kommt, daß bei immunologischer Detektion, wegen der unterschiedlichen Orientierung der klonierten c-DNA und der Wahl des richtigen Leserasters sechsmal so viele Klone benötigt werden als bei Detektion mit Oligonukleotiden. Insbesondere die nötige "blind end ligation" der c-DNA an die "frame shift linker" ist schwierig und der Erfolg nahezu nicht zu überprüfen.

Oligonukleotide können schon auf der m-RNA Ebene für Hybridisierungen eingesetzt werden und natürlich auch bei allen weiteren Schritten. Die ständige Kontrolle aller Manipulationen ist so möglich, was eine der wichtigsten Voraussetzungen für kalkulierbares und reproduzierbares Arbeiten ist.

9.3.2 Detektion positiver Klone in genomischen Genbanken

Im vorhergehenden Kapitel wurden die Nachteile der immunologischen Detektion bereits dargestellt. Auch hier bedingt sie eine Erhöhung der Klonzahl um den Faktor sechs und einige schwierige und verlustreiche Manipulationen bei der Klonierung.

Leider sind aber auch Schattenseiten der Oligonukleotide zu erwähnen. Eine Oligo-Probe, deren zugehöriger Bereich auf der DNA-Ebene durch ein Intron unterbrochen ist, ist wertlos. Es gibt auch keine Möglichkeit, dies bei der Planung der Oligonukleotidsequenz zu berücksichtigen. Der einzige Ausweg ist die Verwendung von mehreren Oligoproben, so daß diese Wahrscheinlichkeit sinkt.

Es soll hier vorweggenommen werden, daß beide Methoden nicht zum Ziel führten. Auf die spezifischen Probleme wird in den folgenden Kapiteln ausführlich eingegangen.

Basierend auf den obigen Überlegungen und den gewonnenen Erfahrungen mit beiden Techniken wurde eine neue Methode konzipiert, die speziell für die Klonierung von Pflanzen-DNA einige Vorteile bietet.

10. Anreicherung von poly-A⁺-m-RNA

10.1 Ausbeute der m-RNA Isolierung

Gesamt-RNA wurde aus 5 Tage altem, in LS-Medium angezogenem Suspensionskulturgewebe (frühe log-Phase) nach der Guanidinium/Cäsiumchlorid - Methode (MANIATIS et.al. (1982)) isoliert.

Der Aufschluß der Zellen erfolgte direkt in der Guanidinium-rhodanidlösung mit einem Potter-Homogenisator (siehe Seite 58).

Aus 30 g Zellgewebe konnten 2.7 mg Gesamt-RNA isoliert werden (1).

Die Abtrennung der poly-A⁺-m-RNA-Fraktion erfolgte mit oligo-dT-Cellulose (2).

Bindepuffer : 20 mM Tris/HCl pH 7.5
0.5 M NaCl
1 mM EDTA

Elutionspuffer : 20 mM Tris/HCl pH 7.5
1 mM EDTA

Eine Säule aus 0.5 g oligo-dT-Cellulose in einer silikonierten Pasteurpipette wurde mit der in Bindepuffer aufgenommenen Gesamt-RNA beladen, mit 3 x 3 ml Bindepuffer gewaschen (Fraktionen B1 - B3) und danach mit 6 x 1 ml Elutionspuffer eluiert (Fraktionen E1 - E6).

Zur Detektion der m-RNA diente die optische Dichte der einzelnen Fraktionen, gemessen bei 260 nm. Abbildung 63 zeigt das aus den Absorptionen der einzelnen Fraktionen erstellte Elutionsprofil.

Fraktion E2 enthielt 49 µg poly-A⁺ m-RNA.

-
- (1) Bei Aufschluß der Zellen durch Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff war die Ausbeute an Gesamt-RNA um 50 % niedriger.
 - (2) Oligo-dT-Cellulose wurde von verschiedenen Firmen bezogen und getestet. Das Produkt der Firma SIGMA war mit Abstand das billigste (1 g / 85.- DM) und zeigte keinerlei Nachteile gegenüber weitaus teureren Präparaten, wie z.B. BOEHRINGER MANNHEIM (1g / 285.- DM).

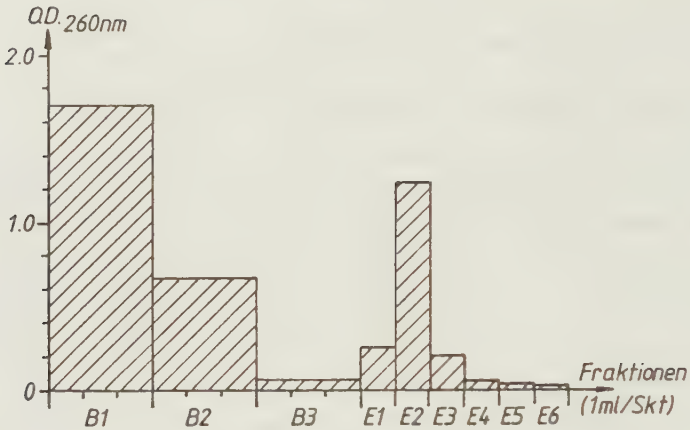


Abb. 63 Elutionsprofil der oligo-dT-Cellulose Säule

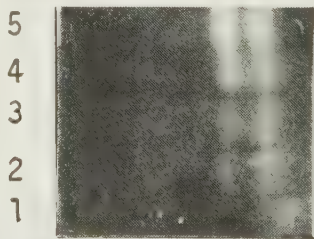
Anreicherungsstabelle

Gewebe	:	30 g Frischgewicht / 1.5 g Trockengewicht
Gesamt-RNA	:	2.7 mg (0.2 % d. Trockengew.)
poly-A ⁺ m-RNA	:	49 µg (1.8 % d. Gesamt-RNA)

Tab. 14 Anreicherungsstabelle für die Isolierung von poly-A⁺-m-RNA aus Suspensionszellkultur Tina30 von R. serpentina

10.2 Hybridisierungen mit 14-mer Oligonukleotid

In Abbildung 64 ist die Auftrennung von 4 verschiedenen Gesamt-RNA Präparationen und einem m-RNA-Isolat in einem Glyoxalgel (siehe Seite 64) zu sehen.



Laufrichtung →

Abb. 64 Glyoxalgelelektrophorese einer m-RNA Präparation (Spur 1) und von vier Gesamt-RNA-Isolaten (Spur 2-5)

Nach Transferierung der RNA auf Nitrocellulose (Northern Blot, siehe Seite 66) wurde mit dem 14-mer Oligonukleotid HA1 (vgl. Seite 187) hybridisiert.

Untersucht wurden 11 Präparationen aus Gewebe mit unterschiedlichen Anzuchtzeiten (2 - 10 Tage LS-Medium) und verschiedenen Aufschlußmethoden (Potter oder flüssiger Stickstoff). In keinem Fall konnte oberhalb 10°C Waschtemperatur ein Hybridisierungssignal erhalten werden (Belichtungszeit bis zu 72 h mit 8-fach Fluoreszenzverstärkerfolie).

Anfangs wurden nur aliquote Teile der isolierten m-RNA - Fraktionen für die Hybridisierungen verwendet, später auch die gesamten Fraktionen. Dennoch konnte kein Signal beobachtet werden.

Ergebnis

Unter der Annahme, daß das Oligonukleotid eine korrekte Sequenz darstellte, mußte daraus geschlossen werden, daß die gesuchte m-RNA in zu geringen Konzentrationen für ein Hybridisierungssignal vorlag.

Weiteren Arbeiten (wie c-DNA-Synthese) wurden deshalb nur sehr geringe Erfolgsaussichten eingeräumt.

Die c-DNA-Synthese ist ein aufwendiges und verlustreiches Verfahren (1). Nur wenn sichergestellt werden kann, daß die einsetzbaren m-RNA-Präparationen in ausreichendem Anteil die gesuchte m-RNA enthalten, kann man erwarten nach der Rückübersetzung, Synthese des zweiten Stranges, Ansetzen von Klonierungslinkern, Ligation in ein Vektorplasmid und Transformation in kompetente Zellen, Klone der gesuchten c-DNA zu erhalten. Da auch nicht bekannt ist, an welcher Position der Aminosäuresequenz des Proteins die für die Ableitung des Oligonukleotidgemisches verwendete Teilsequenz liegt, könnten kurze c-DNA-Stücke der richtigen m-RNA eventuell nicht detektiert werden.

(1) Kommerziell erhältliche c-DNA-Synthesekits waren damals noch nicht verfügbar.
(z.B. AMERSHAM: cDNA synthesis system)

11. Reinigung von Pflanzen-DNA

Da eine Klonierung über m-RNA / c-DNA in der verfügbaren Zeit nicht aussichtsreich erschien, war die logische Konsequenz dieses Ziel über eine genomische Genbank in Angriff zu nehmen.

Die m-RNA für die Strictosidinsynthase tritt wahrscheinlich nur kurzfristig während der Lebensdauer einer Zelle auf, was auf Grund der statistischen Altersverteilung der einzelnen Zellen einer Suspensionskultur bedeutet, daß sehr viel m-RNA von Primärstoffwechsellenzymen, die immer in allen Zellen zu finden ist, sehr wenig spezifische m-RNA der Strictosidinsynthase gegenübersteht.

Im Falle der DNA spielt das Alter einer Zelle keine Rolle mehr. Jede Zelle trägt mindestens einmal pro Genom das gesuchte Gen.

Da aber davon ausgegangen werden muß, daß auch bei dieser Pflanze 85 % des Genoms nicht codierende Regionen sind, braucht man für eine repräsentative Genbibliothek eine sehr hohe Zahl Rekombinanter. Die biotechnologische Bedeutung, die Enzyme wie die Strictosidinsynthase, die die Synthese pflanzlicher Sekundärstoffwechselprodukte katalysieren, bekommen werden, rechtfertigte jedoch jeden Versuch.

Für die Isolierung der Pflanzen-DNA aus Suspensionskulturen wurde eine ganze Reihe von Techniken erprobt.

Die nachfolgend beschriebene Methode hat sich in Laufe einiger Dutzend DNA-Präparationen als optimal herausgestellt. Zum einen berücksichtigt sie den geringen Trockengewichtsanteil der Pflanzenzellen von ca. 5 % des Frischgewichts, es können mit dieser Methode bis zu 500 g Gewebe in einem Arbeitsgang aufgeschlossen werden, und zum anderen werden die enthaltenen Polysaccharide vollständig abgetrennt. Bei den üblichen Ethanolgefällungen copräzipitieren sie mit der DNA, sind später praktisch nicht mehr davon abtrennbar und inhibieren Restriktionsenzyme.

Die üblichen Extraktionen mit Phenol oder Phenol/Chloroform Mischungen entfernen Polysaccharide nur unvollständig.

11.1 Isolierung der Gesamt-DNA aus Suspensionszellkulturen

Zellaufschluß

Eine Suspensionskultur ernten (vgl. Seite 17) und den Gewebekuchen kurz mit destilliertem Wasser waschen.

Etwa 200 g Frischgewicht Gewebe mit flüssigem Stickstoffschockgefrieren und, nachdem die heftige Gasentwicklung aufgehört hat, zusammen mit dem überschüssigen Stickstoff in einen Mixer überführen (z.B. Waring Blendor) und bei hoher Geschwindigkeit 10-mal für 3 Sekunden mahlen (1).

Inhibieren der DNasen, Proteolyse der Proteinfraction

250 ml 0.5 M EDTA pH 8.0 (vorgewärmt auf 70°C) zusetzen und bei langsamer Geschwindigkeit im Mixer homogenisieren.

Den viskosen Brei in eine sterile Weithalsflasche überführen, 12.5 ml 20% Sarkosyllösung (Endkonzentration 0.5 % w/v) und 25 mg Proteinase K (Endkonzentration 50 µg/ml) zusetzen und unter Schütteln auflösen. Den ganzen Ansatz bei 55°C für 4 h in einem Wasserbad inkubieren.

Abtrennen der Zellbruchstücke

Die Suspension im Eisbad unter langsamem Schütteln rasch abkühlen, in autoklavierte Zentrifugenbecher überführen und unter Kühlung 15 min bei 13000 g abzentrifugieren (2).

Den Überstand vorsichtig in einen sterilen 500 ml Meßzylinder dekantieren und das Volumen bestimmen.

Ausfällen der Nukleinsäuren, Abtrennen der Polysaccharide

11 % (v/v) 5 M Natriumchlorid (steril) und 12 % (w/v) Polyethylenglykol 6000 zusetzen und nach vollständigem Lösen für 4 - 12 h auf 4°C kühlen.

Die präzipitierten Nukleinsäuren bei 13000 g (2) abzentrifugieren und das Pellet in kaltem TE-Puffer aufnehmen.

-
- (1) Vorsicht! Deckel nur leicht aufsetzen, damit der freiwerdende Stickstoff entweichen kann.
(2) z.B. SORVALL GSA-Rotor: 10000 Upm

Entfernen adsorbierten Polyethylenglykols

Die DNA/RNA-Lösung zweimal mit dem gleichen Volumen Chloroform : Isoamylalkohol = 24 : 1 extrahieren.

Zur Phasentrennung bei 10000 g für 5 min bei 4°C zentrifugieren (1).

Beim Abnehmen der oberen Phase sehr vorsichtig vorgehen und geringe Verluste in Kauf nehmen.

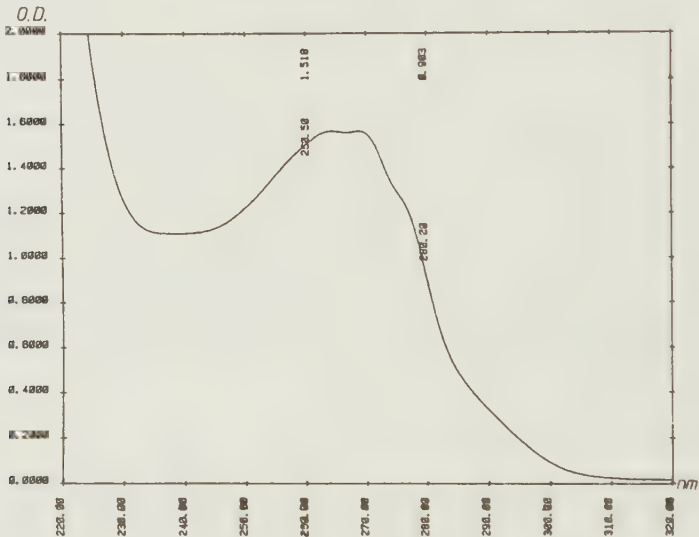


Abb. 64 Spektrum der DNA-Präparation nach der Abtrennung des Polyethylenglykols

OD260/OD280 = 1.67; DNA-Konzentration = 7.6 mg/ml
Volumen : 8 ml
Verdünnung der Meßlösung : 1 : 100

Die DNA-Präparation zeigt bei diesem Reinigungsgrad noch geringe Proteinverunreinigungen (Schulter des DNA-Peaks bei 280 nm). Das O.D._{260nm} / O.D._{280nm} Verhältnis von hier 1.67 und die hohe DNA-Konzentration (hier 7.6 mg/ml) ist Beweis für die Effizienz dieser Aufschluß- und Reinigungsmethode.

Die ermittelte DNA-Konzentration wird für die Planung des Ultrazentrifugationsschrittes später benötigt.

(1) z.B. SORVALL SS-34 Rotor, 10000 Upm

Entproteinieren

Das meiste Protein ist bereits durch die Proteinase K proteolytisch gespalten worden und die resultierenden Peptide blieben im Überstand der Polyethylenglykolfällung.

Der DNA assoziiertes Protein (z.B. Histone) wird von Proteinase K nur unvollständig abgebaut. Mit der Phenolisierung sollen diese Restproteine entfernt werden.

Dazu extrahiert man die DNA-Lösung jeweils mit dem doppelten Volumen der aufgeführten Mischungen:

1 x Phenol

2 x Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol = 25 : 24 : 1

2 x Chloroform : Isoamylalkohol = 24 : 1

Zur Beschleunigung der Phasentrennung 5 min bei 6000 g (2) zentrifugieren.

Dichtegradientenzentrifugation

Die DNA-Lösung mit TE-Puffer auf eine Konzentration von 0.8 mg/ml verdünnen.

Pro Milliliter Lösung 1 g Cäsiumchlorid und 50 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zusetzen.

In Quickseal-Röhrchen in einem Ti50 - Rotor bei 15°C und 45000 Upm 36 h zentrifugieren und die DNA-Banden abziehen.

Extraktion des Ethidiumbromids

Die DNA-Lösung sooft mit Cäsiumchlorid-gesättigtem Isopentanol extrahieren, bis es farblos bleibt (Ethidiumbromid geht in die organische Phase über und färbt sie intensiv violett).

Entsalzen

Zur Entfernung des Cäsiumchlorids die DNA-Lösung 12 h gegen je 1 l TE-Puffer, bei zweimaligem Wechsel, bei 4°C dialysieren.

(1) z.B. SORVALL SS-34 Rotor, 13000 Upm
(2) z.B. SORVALL SS-34 Rotor, 8000 Upm

Charakterisierung der Präparation

Konzentration und Reinheit an Hand eines Spektrums des Bereichs 220 - 320 nm bestimmen.

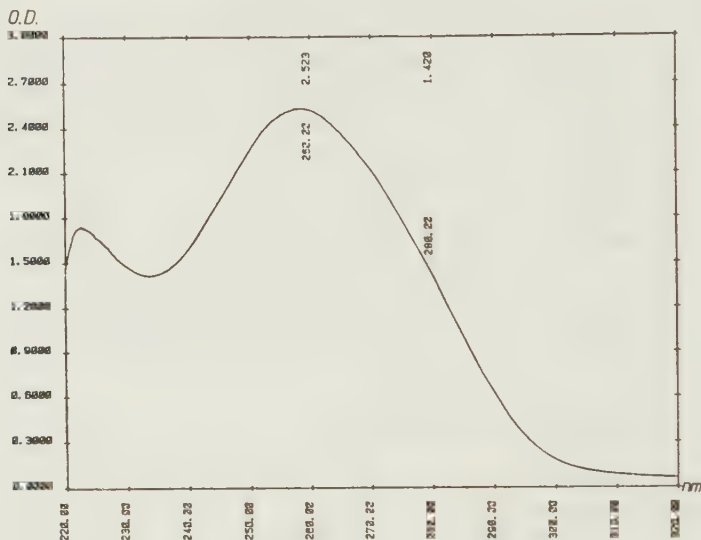


Abb. 65 Spektrum der resultierenden DNA-Präparation
OD260/OD280 = 1.8 ; DNA-Konzentration : 0.75 mg/ml
Volumen : 17 ml
Verdünnung der Meßlösung : 1:6 in TE-Puffer

Ausbeute

Aus 200 g Frischgewicht, entsprechend 10 g Trockengewicht, wurden 12 mg DNA isoliert (0.13 % des Trockengewichts). Bei den Extraktionen geht immer etwas DNA in den Interphasen verloren. Diese könnten jeweils reextrahiert und dadurch die Ausbeute gesteigert werden. Dadurch erklärt sich auch die relativ niedrige Ausbeute von nur etwa 40% des Literaturwertes (GIERSON (1984)).

Ergebnis

Die so präparierte DNA läßt sich gut schneiden, ist frei von RNA und enthält keine niedermolekularen Anteile.

11.2 Bestimmung des G/C-Gehaltes

Neben der grundsätzlichen Bedeutung der Bestimmung des G/C-Gehaltes, er ist ein Charakteristikum jeder Spezies, kann daraus die Schwimmdichte der DNA abgeleitet werden (DE LEY (1970)) und hat so praktische Bedeutung für die Planung von Ultrazentrifugationsexperimenten.

Die Schmelzkurve der DNA hat sigmoiden Charakter, wenn keine Strukturierung der DNA vorliegt. Die dem Wendepunkt entsprechende Temperatur ist mit dem G/C-Gehalt der DNA korreliert. Die beobachtete relative Absorptionsänderung ist ein sensitives Reinheitskriterium der DNA. Mechanisch gescherte DNA und DNA, die viele Strangbrüche enthält, liegt bereits bei 70°C, der Starttemperatur der Schmelzkurve, einzelsträngig vor. Nur der Anteil hochmolekularer doppelsträngiger DNA trägt zur Absorptionsänderung während des Aufheizvorganges bei.

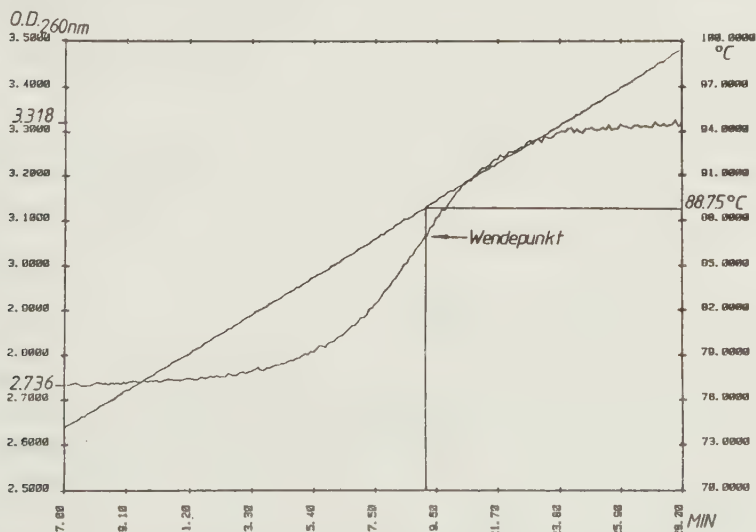


Abb. 66 Bestimmung der Hyperchromizität von DNA aus R. serpentina Suspensionszellkultur Tina30

Meßbedingungen: Temp.Grad.: 1 °C/min
DNA-Konz.: 130 µg/ml
Puffer: 1x SSC (1)

(1) vgl. MANIATIS et.al. (1982)

Die technische Ausrüstung für die Messung ist auf Seite 68 beschrieben.

Es wurde eine Hyperchromizität von 21.3% gemessen, das sind 61% des theoretischen Maximums von 35% und ein Indiz für schonende DNA-Präparation, da bereits geringe Anteile fragmentierter DNA die Hyperchromizität empfindlich beeinflussen (FELSENFELD (1971)).

Als Schmelztemperatur wurde 88.75°C in 1x SSC-Puffer ermittelt.

Anhand des von DE LEY (1970) angegebenen Zusammenhangs errechnet sich:

G/C - Gehalt	: 47.5 %
rel. Schwimmdichte	: 1.71

Die errechnete Schwimmdichte stimmt mit den empirisch ermittelten Daten überein, der G/C-Gehalt entspricht dem von anderen Pflanzen beschriebenen (DE LEY (1970)).

11.3 Anwendung auf andere Zellkulturen

Die vorgestellte DNA-Präparationsmethode wurde auch mit Zellkulturen von

Rosa canina

Berberis wilsoniae

Catharanthus roseus

mit Erfolg durchgeführt.

Bei analytischer Beladung der Ultrazentrifugationsröhrchen war bei allen untersuchten Zellkulturen eine deutliche Strukturierung der DNA-Fraktion in zwei Banden zu beobachten, in Chloroplasten-DNA und Kern-DNA.

Das Material beider Banden wurde grundsätzlich vereinigt, da u.a. auch sogenannte Satelliten-DNA veränderte Schwimmdichte zeigen kann.

Die Chloroplasten-DNA stellt etwa 1 - 10 % der Gesamt-DNA dar.

12. Klonierung mit Lambda-Phagen

12.1 Auswahl eines geeigneten Phagen

Für eine Genbank eines so großen Genoms kommen nur Substitutionsvektoren in Frage.

Als Standardbeispiel wird bei WINNACKER (1984) und MANIATIS et.al. (1982) der Phage Charon 4A (vgl. Seite 69) beschrieben.

Mit seiner Kapazität von 8-22 kb gehört er zu den Lambda-Phagen mit den höchsten Klonierungsbereichen. Die Limitierung der Fragmentgröße nach unten ist besonders wertvoll für die Anlage einer Genbank, da dadurch verhindert wird, daß Rekombinante mit nur geringem Fremd-DNA-Anteil vorkommen können.

Charon 4A trägt den p_L -Promotor(1), kann also als Expressionsvektor (mit Einschränkungen) auch mit immunologischen Detektionssystemen verwendet werden.

Durch die lac5 - Funktion wird eine bequeme visuelle Identifizierung von Rekombinanten ermöglicht.

Für die vollständige genetische Charakterisierung und die Konstruktion des Phagen Charon 4A vergleiche BLATTNER et.al. (1977) und WILLIAMS und BLATTNER (1979).

12.2 Gewinnung von Phagenpartikeln

Charon 4A - DNA wurde von der Firma AMERSHAM, Braunschweig, bezogen.

Durch in vitro-Verpackung(2) konnten infektiöse Phagenpartikel mit guter Ausbeute erhalten werden (7×10^7 pfu/ μ g), die über Chloroform gelagert wurden.

Für die Phagenvermehrung und die Gewinnung der Phagen-DNA siehe Seite 70.

(1) Phage leftward promotor;
Für eine detaillierte Beschreibung der Transkriptionskontrolle vgl. ADYHA et.al. (1974)

(2) BOEHRINGER MANNHEIM, DNA packaging kit

12.3 Präparation eines effizienten Vektors

In Abbildung 67 ist der Charon 4A Phage schematisch dargestellt. Die Positionen der Restriktionsschnittstellen entsprechen den Angaben von DE WET et.al. (1980).

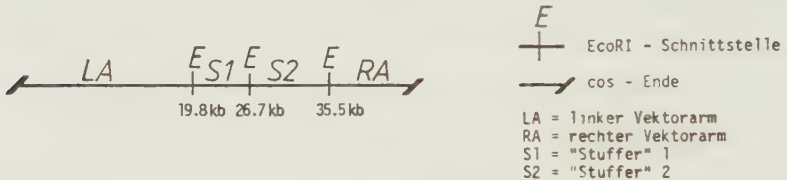


Abb. 67 Schematische Darstellung des Phagen Charon 4A

Für die Klonierung müssen die beiden "Stuffer" entfernt werden, damit an ihre Stelle die Fremd-DNA eingesetzt werden kann.

Zerschneidet man die Vektor-DNA direkt mit EcoRI-Endonuclease, resultieren vier Fragmente mit 19.8, 10.9, 7.8 und 6.9 kb Länge, aus denen nur schwer die beiden Vektorarme (19.8 und 10.9 kb) abzutrennen wären.

Bei vorausgehender Ligation der cos-Enden des Phagen entsteht neben den beiden kleinen Stuffermolekülen ein 30 kb großes Vektorfragment, bei dem diese Aufgabe leicht zu bewältigen ist.

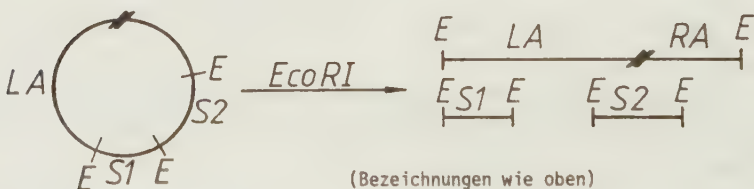


Abb. 68 Fragmentierung von Charon 4A - DNA nach Ligation der cos - Bindungsstellen

Würde zu einer verdünnten Lösung von Phagen-DNA Ligase zugesetzt, verliefte dieser Vorgang nur mit sehr geringer Effizienz, da die Ligationsrate stark von der Konzentration der freien Enden abhängig ist (vgl. MANIATIS et.al. (1982)).

Mit der von PFEIFFER und ZIMMERMANN (1983) beschriebenen PEG-Ligations-Methode läßt sich die Ausbeute wirkungsvoll steigern.

12.3.1 Ligation der Vektor-DNA zu linearen Multimeren

<u>Ligationsansatz</u>	<u>10x Ligationspuffer</u>
41 µl T4-DNA Ligase (1 U/µl)	50 mM Tris/HCL pH 7.8
25 µl 10x Ligationspuffer	0.5 mM ATP
94 µl 40 % Polyethylenglykol 6000	10 mM Mercaptoethanol
90 µl Charon 4A DNA (0.55 µg/µl)	5 mM MgCl ₂
250 µl	

Den Ansatz ohne T4-Ligase für 10 min auf 65°C erwärmen, auf 14°C abkühlen, dann die Ligase zusetzen und für 16 h bei 14°C inkubieren.

Der Polyethylenglykolzusatz bindet Wasser und stimuliert so die Aneinanderlagerung der cos-Bindungsstellen. Seine lineare Struktur erzwingt, durch Anlagerung an die DNA, deren lineare Ausrichtung.

Mit T4-DNA Ligase können die cos-Bindungsstellen auch unter diesen Bedingungen ligiert werden.

Rückgewinnen der DNA, Entfernen des Polyethylenglykols

Die Vektor-DNA durch Zentrifugation des Ligationsansatzes für 15 min bei 4°C und 10000 g (1) pelletieren. Das DNA-Sediment in TE-Puffer aufnehmen, 3 x mit je 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1) ausschütteln, um adsorbiertes Polyethylenglykol zu zerstören, anschließend den ganzen Ansatz für 5 min auf 65°C erwärmen.

(1) z.B. EPPENDORF, 5414 Zentrifuge

EcoRI-Restriktion

Das Volumen der DNA-Lösung bestimmen und mit Aqua bidest. auf 250 µl auffüllen.

Restriktionsansatz

250 µl DNA-Lösung

30 µl 10x EcoRI-Puffer (1)

300 U EcoRI-Endonuclease

ad 300 µl Aqua bidest.

Den Ansatz mischen, 4 h bei 37°C inkubieren und anschließend die Reaktion durch Erhitzen des Ansatzes auf 65°C stoppen.

Den Erfolg der Restriktion auf einem Minigel überprüfen.

Es müssen drei Banden zu erkennen sein (30.7, 7.8, 6.9 kb).

12.3.2 Trennung der DNA-Fragmente in Saccharosegradienten

Die Herstellung des Saccharosegradienten ist auf Seite 60 beschrieben.

Für die Trennung wird ein Gradient von 10 - 40 % Saccharose gewählt.

Zentrifugationsbedingungen

Rotor : Swingout - Rotor
z.B. SORVALL AH 627

Drehzahl : 25000 Upm

Temperatur: 15 °C

Dauer : 26 h

Beladung : max. 25 µg DNA-Lösung in 100 µl

Den Lauf ohne Bremse stoppen, um scharfe Banden zu erhalten.

Die Röhrchen werden ausgetropft und in 500 µl Fraktionen aufgefangen. Von jeder zweiten Fraktion 5 µl in einem 0.8 % Agarosegel einer Elektrophorese unterziehen, um die Vektorhaltigen Fraktionen zu finden und die Trennung der Fragmente zu kontrollieren.

(1) entsprechend den Angaben des jeweiligen Herstellers

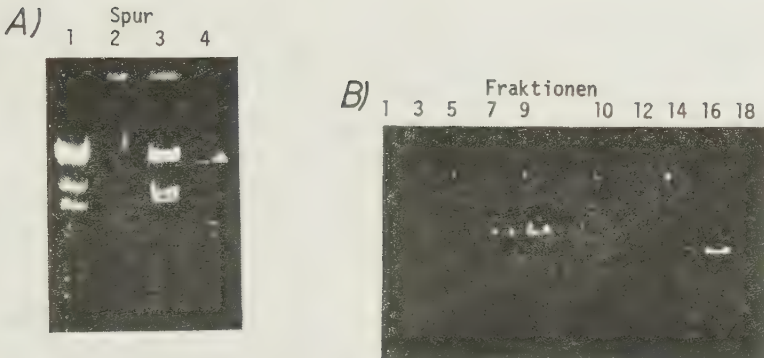


Abb. 69 Fraktionierung von Charon 4A - DNA mit Hilfe eines Saccharosegradienten in die ligierten Charon 4A - Arme und die beiden "Stuffer"-Fragmente

A) 0,8 % Agarosegel

- 1) DNA-Größenstandard Lambda-DNA x HindIII (23.6, 9.6, 6.6, 4.3, 2.2, 2.0 kb)
- 2) 1 µg Charon 4A-DNA nach Ligation der cos-Enden mit T4-Ligase zu linearen Multimeren. Man erhält hochmolekulare DNA; zu erkennen am Verschmieren der DNA-Bande und dem Rückstand in der Auftragstasche. (PEG-Ligation)
- 3) 3 µg lineare Multimere von Charon 4A nach Restriktion mit EcoRI. Es sind die beiden "Stuffer"-Fragmente des Phagen (7.8, 6.9 kb) und die 30.7 Kb große Vektor-DNA zu erkennen (Trennung im Saccharosegradienten).
- 4) 1 µg Charon 4A DNA mit T4-Ligase ohne Polyethylenglykolsatz ligiert. Es sind wenig hochmolekulare Anteile zu erkennen.

B) Fraktionen des Saccharosegradienten
je 1 % der angegebenen Fraktionen
(0.8 % Agarosegel)

Fraktionen 7-9 enthalten die Vektor-DNA,
Fraktionen 14-16 die "Stuffer"-Fragmente

Die Fraktionen 7 - 9 enthalten die ligierten Arme und wurden vereinigt. Die kleineren "Stuffer" - Fragmente sind deutlich abgetrennt (Fraktionen 14 u. 16).

12.3.3 Verifizierung der Vektorcharakteristika

Der präparierte Charon 4A - Vektor, die ligierten Arme des Charon 4A - Phagen, wird auf folgende Kriterien überprüft:

- Größe des Vektors
- Identität
- Intaktheit der EcoRI - Klonierungsstellen

Zur Abschätzung der Größe des Vektors verwendet man ein 0.5 % Agarosegel und mit HindIII - Endonuclease gespaltene Lambda-DNA als Größenstandard. Die Vektor-DNA muß länger als das größte Spaltungsfragment (23.6 kb) der Lambda-DNA sein und im darunterliegenden Bereich darf keine DNA nachweisbar sein.

Die Überprüfung der Identität und der Intaktheit der EcoRI-Schnittstellen erfolgt in einem Arbeitsgang durch folgende Experimente:

- 1) Ligation der Charon 4A - Vektor DNA nach der PEG-Methode (siehe oben) zu Multimeren. Es muß hochmolekulare DNA entstehen.
- 2) Restriktionsanalyse von Charon 4A - Vektor DNA, ohne und mit vorausgehender Ligation der EcoRI-Schnittstellen, mit den Endonucleasen BamHI und HindIII. Es müssen charakteristische Unterschiede in den Bandenmustern zu beobachten sein, die ein zuverlässiges Kriterium für die Identität des Vektors und die Intaktheit der EcoRI-Klonierungsstellen sind.

Die folgenden Abbildungen verdeutlichen dieses Experiment.

BamHI :	5.5 kb (B1)	EcoRI :	19.8 kb (E1)
	39.5 kb (B2)		34.5 kb (E2)
	40.0 kb (B3)		
	43.9 kb (B4)	HindIII :	39.7 kb (H)

Tab. 14 Positionen einiger Schnittstellen ausgewählter Endonucleasen und Einführung der im weiteren verwendeten Kurzbezeichnungen (nach De WET et.al. (1980))

Die Positionsangaben der Schnittstellen beziehen sich auf die vollständige Charon 4A - DNA; für das Vektor - DNA - Molekül stellen sie keine absoluten, sondern nur relative Angaben dar, da der Bereich von 19.8 - 34.5 kb entfernt wurde.

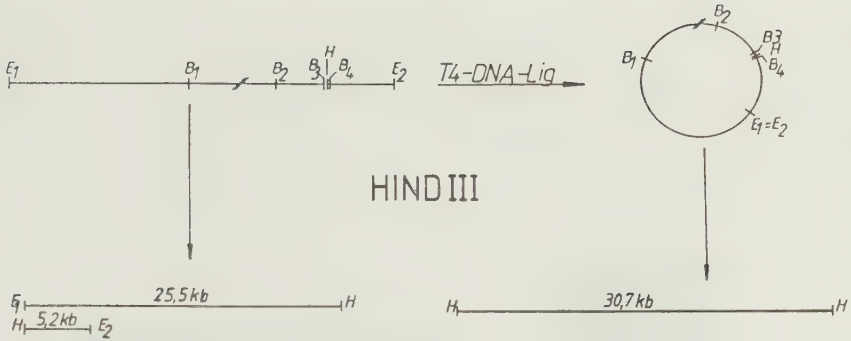


Abb. 70 Zu erwartende Fragmentierungsmuster bei Spaltung linearer und an den EcoRI-Schnittstellen ligierter Charon 4A - Vektor DNA mit HindIII-Endonuclease

Der Charon 4A - Vektor hat nur eine HindIII - Schnittstelle im Bereich der beiden Vektorarme. Lineare Vektor-DNA ergibt zwei Fragmente bei Spaltung mit HindIII, wogegen aus circularisierter oder polymerer DNA nur ein Fragment resultiert, was beweist, daß die EcoRI-Schnittstelle intakt ist.

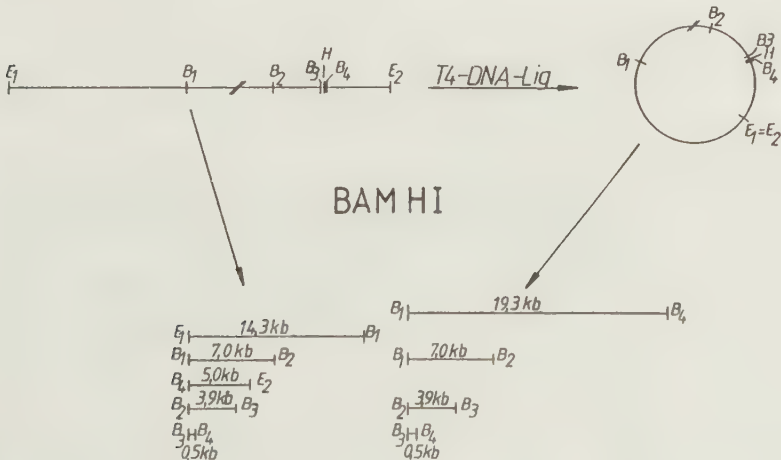


Abb. 71 Postulierte Fragmentierungsmuster bei Spaltung von linearer und an den EcoRI-Schnittstellen ligierter Charon 4A - Vektor DNA mit BamHI-Endonuclease

Der charakteristische Unterschied ist das Fehlen der 5.0 kb-Bande bei ligierter, gegenüber linearer Vektor-DNA.

Für die einzelnen Tests werden je 0.5 µg der präparierten Charon 4A - Vektor DNA eingesetzt.

Die Ligationsansätze werden in einem Volumen von 5 µl durchgeführt und nach den Restriktionsreaktionen vollständig auf einem Minigel analysiert.

(Ligationen mit T4-DNA-Ligase, vgl. MANIATIS et.al. (1982))

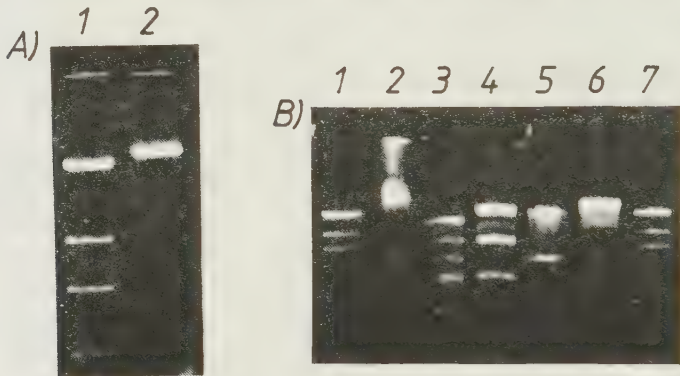


Abb. 72 Analyse einer Charon 4A - Vektor Präparation

- A) 0.5 % Agarosegel
- 1) Lambda-DNA x HindIII - Größenstandard
(23.6, 9.6, 6.6, 4.3 kb)
 - 2) 0.5 µg Charon 4A - Vektor DNA
- B) 0.8 % Agarosegel
- 1) Lambda-DNA x HindIII - Größenstandard
 - 2) Charon 4A - Vektor DNA mit T4-DNA-Ligase nach der PEG-Methode (siehe oben) zu hochmolekularer DNA ligiert.
 - 3) Charon 4A - Vektor DNA x BamHI
 - 4) Charon 4A - Vektor DNA x T4-DNA-Ligase mit nachfolgender Restriktion durch BamHI
 - 5) Charon 4A - Vektor DNA x HindIII
 - 6) Charon 4A - Vektor DNA x T4-DNA-Ligase mit nachfolgender Restriktion durch HindIII
 - 7) wie 1)
- 2 - 6) je 0.5 µg Charon 4A - Vektor DNA

Ergebnis

Der präparierte Charon 4A - Vektor entspricht in seinen Bandenmustern den Voraussagen.

Damit ist u. a. sichergestellt, daß die EcoRI-Schnittstellen, die für die Klonierung wichtig sind, ligierbar sind, also auch Fremd-DNA in diese Positionen eingeführt werden kann.

12.4 Gewinnung von Pflanzen-DNA-Fragmenten für die Klonierung mit Charon 4A - Vektor

Für die Klonierung sind nur Fragmente mit zwei EcoRI-Enden und einer Größe von 8-22 kb geeignet. Da nur ein Restriktionsenzym für die Präparation der DNA-Fragmente benutzt werden kann, darf nicht jede enthaltene EcoRI-Schnittstelle tatsächlich geschnitten werden, sonst würden alle Fragmente mit weniger als 8 kb Abstand der EcoRI-Sequenzen verlorengehen.

Partielle Spaltungen der Pflanzen-DNA

Es werden Restriktionsansätze mit 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 und 0.0125 U EcoRI-Nuclease pro µg Pflanzen-DNA verwendet.

Restriktionsansätze

4 µl Pflanzen-DNA (12 µg)
2 µl 10x EcoRI-Puffer (1)
4 µl EcoRI-Verdünnung
10 µl Aqua bidest.

20 µl

Inkubieren bei 37°C für 1 h.

Stoppen der Reaktion durch Zusatz von 10 µl Agarosebeads (siehe Seite 65) und Erhitzen auf 70°C für 5 min.

Nach dem Abkühlen in einem 0.5 % Agarosegel (low melting point Agarose) zusammen mit HindIII gespaltenen Lambda-DNA als Größenstandard auftrennen.

Den Bereich der Pflanzen-DNA zwischen den beiden obersten Bändern des Lambda-DNA Größenstandards (23.6 und 9.6 kb) ausschneiden, die DNA extrahieren (siehe Seite 61) und die Konzentration bestimmen.

(1) entsprechend den Angaben des Herstellers

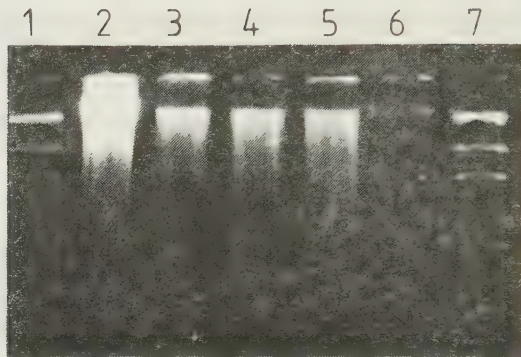


Abb. 73 Limitierte Spaltung von DNA aus *R. serpentina* Zellkultur Tina30 mit EcoRI-Endonuclease

0.5 % Agarosegel

- 1) u. 7) Lambda-DNA gespalten mit HindIII-Endonuc.
2 - 6) Spaltungen von Tina30-DNA mit verschiedenen Konzentrationen EcoRI-Endonuclease
- | | | |
|----|--------|------|
| 2) | 0.0125 | U/μg |
| 3) | 0.025 | U/μg |
| 4) | 0.05 | U/μg |
| 5) | 0.1 | U/μg |
| 6) | 0.2 | U/μg |

12.5 Ligation der DNA-Fragmente aus Tina30 mit Charon 4A - Vektor-DNA, in vitro - Verpackung und Bestimmung der Rekombinanzzahl

Verschiedene molare Verhältnisse von Vektor-DNA zu Pflanzen-DNA wurden getestet:

Vektor/Fremd-DNA	3/1	1/1	1/3	
Ch.4A - DNA (0.2 μg/μl)	4.5	1.5	1.5	
Tina30-Frag. (0.2 μg/μl)	1.5	1.5	4.5	(alle Angaben in μl)
10xLig.Puffer	1.0	0.5	1.0	
T4-DNA-Lig. (1 U/μl)	1.0	0.5	1.0	
Vol. (μl)	8	4	8	
Konz. (μg/μl)	0.15	0.15	0.15	

Inkubation bei 14°C für 16 h.

Die DNA aus den Ligationsansätzen wurde durch in vitro - Verpackung in infektiöse Phagenpartikel überführt.

Zur Detektion der Rekombinanten dienten X-Gal-Platten (siehe Seite 71).

Als Wirtsstamm wurde Y1088 (vgl. Seite 70) verwendet, der schon zur Anzucht der Phagen für die Präparation der Vektor-DNA benutzt wurde.

Die Ausbeuten an Rekombinanten aus den obigen Ligationsansätzen und die Umrechnung auf Plaque bildende Einheiten pro Mikrogramm DNA und Mikrogramm eukaryotischer DNA ist in Tab. 15 zusammengestellt.

Vektor/Fremd-DNA	3/1	1/1	1/3
pro Verpackung (0.3 µg)	2500	5500	350
pfu/µg - DNA	8.2×10^3	1.8×10^4	1.1×10^3
pfu/µg - eukary.DNA	2.2×10^4	4.9×10^4	3.0×10^3
Prozent Rekombinante	94%	97%	100%

pfu = Plaque bildende Einheit

Tab. 15 Ausbeute an Rekombinanten bei verschiedenen molaren Verhältnissen von Vektor-DNA zu Fremd-DNA

Aus Tabelle 15 ist zu ersehen, daß mit dem präparierten Charon4A - Vektor praktisch nur rekombinierte Vektor-DNA lebensfähige Phagen ausbilden kann.

Annähernd äquimolare Verhältnisse von Fremd-DNA und Vektor-DNA erbringen die höchsten Ausbeuten.

Die erreichten Plaquezahlen pro Mikrogramm eukaryotischer DNA decken sich mit den von MANIATIS et.al. (1978) erzielten Ausbeuten bei der Herstellung einer Genbibliothek für das Kaninchen-Genom.

Mehrere Einzelverpackungen wurden zu einer Genbank Tina30A₀ vereinigt. Sie enthält 36400 Plaque bildende Einheiten.

Die Genbank wurde in Y1088 amplifiziert (siehe MANIATIS et.al. (1982)). Die amplifizierte Genbank trägt den Namen Tina30A₁.

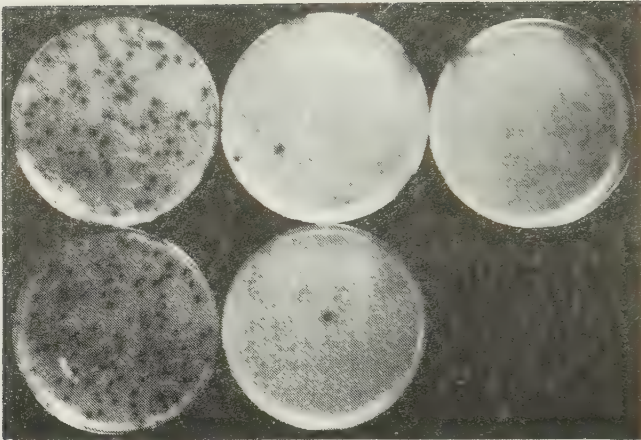


Abb. 74 Bestimmung des Titters der Tina30A₁ - Genbank
Mit je 100 μ l verschiedener Phagenverdünnungen
aus Tina30A₁ E. coli Y1088 infiziert
Die Verdünnungsstufen von links nach rechts:
1:100 1:10000 1:1000000
Titer : 1.1 x 10⁷ pfu/ml
Volumen : 50 ml
Rekombinante : 98.6 %

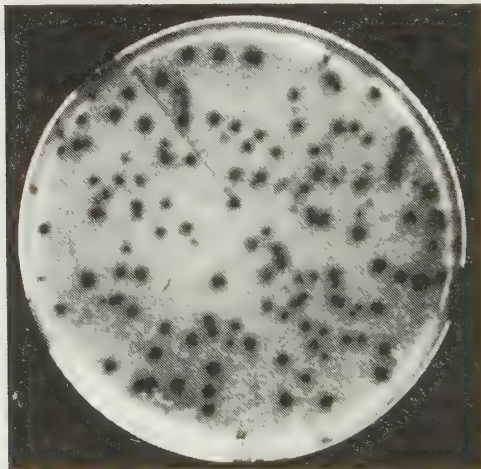


Abb. 75 Tina30A₁ - Genbank (Verd. 1 : 100)
Mit 100 μ l Verdünnung 1:100 E. coli Y1088
infiziert
Bestimmung des Anteils nicht rekombinierter
Phagen (dunkle Punkte)

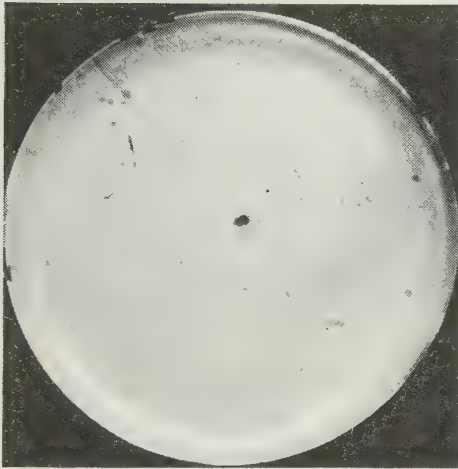


Abb. 76 Tina30A₁ - Genbank (Verdünnung 1 : 10000)
Mit 100 µl Verdünnung 1:10000 E. coli Y1088
infiziert

Bestimmung des Phagentiters

dunkle Punkte	: unveränderte Phagen
helle Höfe im Bakterienrasen	: rekombinierte Phagen

12.6 Nachweis der Klonierung von Pflanzen-DNA

Von 20 Plaques der Platte in Abbildung 26 wurden Einzelpräparationen der Phagen-DNA gemacht (vgl. Seite 70).

Durch Restriktion mit EcoRI-Endonuclease rekonstituierten die Phagen-DNA-Arme und die klonierten Fremd-DNA Fragmente. Nach Auftrennen der Restriktionsansätze in Agarosegelen, zusammen mit einem DNA-Größenstandard aus HindIII gespaltener Lambda-DNA, konnte die Länge der einzelnen DNA-Fragmente bestimmt werden; deren Summe ergab die Gesamtlänge der klonierten Fremd-DNA.

Es ergab sich ein durchschnittlicher Fremd-DNA - Anteil von 18 kb pro Phage.

Die mit EcoRI-Endonuclease erzielten Bandenmuster bewiesen, daß die eingesetzte Pflanzen-DNA, wie gewünscht, einer limitierten Spaltung entstammte.

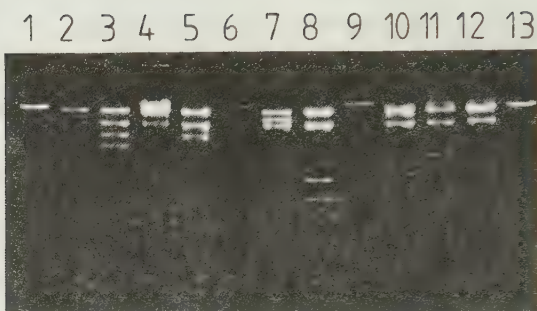


Abb. 77 Analyse einiger rekombinanter Lambda-Phagen-Klone
0.6% Agarosegel

- 1) Lambda-DNA x HindIII
- 2) Charon 4A -Arme (1 µg)
- 3) Phage 1 x EcoRI
- 4) Phage 2 x EcoRI
- 5) Phage 3 x EcoRI
- 6) Phage 4 (0.5 µg)
- 7) Phage 4 x EcoRI
- 8) Phage 5 x EcoRI
- 9) Phage 6 (0.5 µg)
- 10) Phage 6 x EcoRI
- 11) Phage 7 x EcoRI
- 12) Phage 8 x EcoRI
- 13) Lambda-DNA x HindIII

3-5, 7, 8, 10-12 : je 15 µg Phagen-DNA

Einige der Fremd-DNA-Banden wurden ausgeschnitten und durch Rückhybridisierungen der durch "nick-translation" (vgl. S. 80) radioaktiv markierten Fragmente gegen genomische DNA aus R. serpentina bewiesen, daß sie klonierter Pflanzen-DNA entsprechen.

In Abbildung 78 ist dieses Experiment am Beispiel der 5 kb - Bande des Phagen-Klons P7 (vgl. Abb. 77, Spur 11, 3. Bande von oben) dargestellt. Die Hybridisierungen wurden, wie auf S. 83 beschrieben, bei einer Temperatur von 65°C durchgeführt.

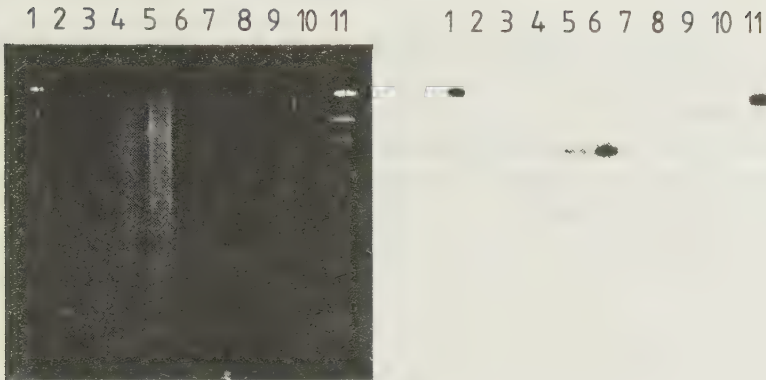


Abb. 78 Beweis der Klonierung von Pflanzen-DNA durch homologe Hybridisierung isolierter Phagen-DNA-Fragmente gegen genomische DNA aus Tina30 Zellkultur von *R. serpentina*, am Beispiel der 5 kb - Bande des Phagen-Klons P7 aus Abbildung 77

- A) 0,6 % Agarosegel
- | | | | | |
|-----|------------|---|---------|------------------------------|
| 1) | Lambda-DNA | x | HindIII | |
| 2) | Tina30-DNA | x | HaeIII | |
| 3) | " | x | AluI | 2 - 5) je 8 µg DNA |
| 4) | " | x | HindIII | aus Tina30 |
| 5) | " | x | Eco RI | |
| 6) | 5 kb Bande | | | aus Phagen-Klon P7 (Abb. 77) |
| 7) | Tina30-DNA | x | EcoRI | |
| 8) | " | x | HindIII | 7 - 10) je 3 µg DNA |
| 9) | " | x | AluI | aus Tina30 |
| 10) | " | x | HaeIII | |
| 11) | Lambda-DNA | x | HindIII | |
- B) Autoradiogramm des zugehörigen Nitrocellulose-filters des gezeigten Gels ("Southern-Blot") nach Hybridisierung mit "nick-translatiertem" 5 kb-Fragment des Klons P7 (vgl. Abb. 77)
- Temperatur : 65°C
Belichtung : 8 h bei -70°C mit 8-fach
Fluoreszenzverstärkerschirm

Hiermit ist bewiesen, daß als Rekombinante detektierte Phagen tatsächlich zu Pflanzen-DNA von *R. serpentina* aus Tina30 Zellkultur homologe Fragmente enthalten.

12.7 Komplexität der Tina30A₁ - Genbank

Anhand der Formel von CLARK und CARBON (1976) läßt sich die Wahrscheinlichkeit für die Repräsentierung eines Gens, das nur in einer Kopie pro Genom vorliegt, in einer Genbank berechnen.

Da die Größe des Genoms von Rauwolfia serpentina nicht bekannt ist, auf Grund der hohen Schwankungsbreite der Größe von Pflanzengenomen (0.01 - 100-fach des Human-Genoms) auch keine Standardwerte verwendet werden können, läßt sich nur eine Korrelation zwischen der Repräsentierung eines beliebigen DNA-Bereichs und der Gesamtgenomgröße angeben. Unberücksichtigt bleibt auch die Kopienzahl des gesuchten Gens pro Genom; für die Berechnung wird mit einer Kopie pro Genom der ungünstigste Fall angenommen.

$$(I) \quad N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1 - I/G)} \quad (\text{CLARK und CARBON (1976)})$$

N = Zahl der Klone

P = Wahrscheinlichkeit für die Repräsentierung eines bestimmten Gens

I = Durchschnittliche Größe der klonierten DNA-Fragmente

G = Genomgröße der Stammpflanze

Nach Umformung von (I) ergibt sich:

$$(II) \quad P = 1 - (1 - I/G)^N$$

Die Größe des Human-Genoms (9×10^6 kb) wird als Bezugsgröße verwendet.

Mit I = 18 kb und N = 36400 ergibt sich:

Genomgröße in Prozent des Human-Genoms	Wahrscheinlichkeit für die Repräsentierung eines "single-copy" - Gens
1	99.9 %
5	77 %
10	52 %
50	14 %
100	7 %

Tab. 16 Wahrscheinlichkeit für die Repräsentierung eines "single-copy" - Gens in der Genbank Tina30A₁

12.7 Suche mit Oligonukleotiden nach hybridisierenden Phagenklonen

Aus Aliquots der Genbank Tina30A₁ wurde die Phagen-DNA isoliert und nach Restriktion mit EcoRI in einem Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert (vgl. SOUTHERN (1975) und S.66) und mit dem Oligonukleotidgemisch HA5 (vgl. Seite 187) hybridisiert.

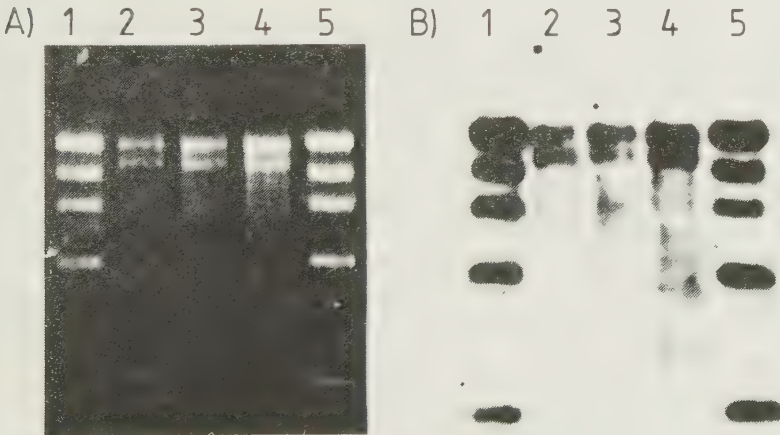


Abb. 79 Hybridisierung des Oligonukleotidgemisches HA5 gegen EcoRI gespaltene Phagen-DNA aus der Genbank Tina30A₁

- A) 0,6 % Agarosegel
 1) Lambda-DNA x HindIII
 (Größenstandard)
 2 - 4) Phagen-DNA aus Tina30A₁ x EcoRI
 2) 10 µg
 3) 15 µg
 4) 20 µg
 5) wie 1)
- B) Autoradiogramm des Nitrocellulosefilters zum nebenstehenden Gel nach Hybridisierung mit Oligonukleotidgemisch HA5
 Temperatur : 20°C

Abbildung 79 zeigt deutlich, daß das verwendete Oligonukleotidgemisch mit den Lambda-DNA-Anteilen der Rekombinanten kreuzreagiert.

Plauehybridisierungen wurden deshalb für inpraktikabel gehalten, da durch die starke Anhebung des Hintergrundes der Hybridisierungen eine Differenzierung zwischen "positiven" und "negativen" Klonen sehr erschwert würde.

Daneben tauchte noch ein anderes Problem auf. Durch Entfernen der beiden inneren "stuffer"-Regionen des Charon 4A - Phagen ändern sich seine genetischen Charakteristika. Der intakte Charon 4A - Phage ist gam^+ , Rekombinante sind gam^- . Das impliziert aber, daß für eine effiziente Propagierung von Rekombinanten der Wirtsstamm recBC^- sein muß (vgl. CLOVER (1985)). Diese Anforderung erfüllte der verwendete Stamm Y1088 nicht (genetische Charakterisierung siehe Seite 70). Selbst beim Lieferanten der Charon 4A - DNA war ein geeigneter Bakterienstamm nicht zu beschaffen. Die beschriebenen Stämme sind zur Vermehrung des Originalphagen sehr wohl geeignet, Rekombinante vermehren sich jedoch nur sehr langsam und unterschiedlich schnell.

Kurz vor Fertigstellung dieser Arbeit konnte Herr H. AUER, Institut für Genetik und Mikrobiologie, Universität München, einen geeigneten Wirtsstamm konstruieren (pers. Mitteilung).

Die Arbeiten mit der Genbibliothek Tina30A₁ wurden auf Grund der oben dargestellten Probleme und des wahrscheinlich noch zu geringen Umfanges der Bibliothek eingestellt.

Ein wesentliches Kriterium für die Wiederaufnahme der Untersuchungen bzw. die Erweiterung dieser Genbank ist die Kenntnis der Genomgröße von R. serpentina, denn nur daraus können die Anforderungen an eine repräsentative Genbibliothek für diese Pflanze abgeleitet werden.

13. Klonierung vorselektierter Pflanzen-DNA

Beide Verfahren, m-RNA Isolierung / c-DNA Synthese und genomische Genbanken mit Lambda-Phagen, weisen für die Suche nach dem Gen der Strictosidinsynthase aus R. serpentina jeweils spezifische Nachteile auf.

Die Klonierung über m-RNA / c-DNA, die bei einigen induzierbaren Pflanzenenzymen und Pflanzenproteinen, die nur in bestimmten Pflanzenteilen auftreten (unter Ausnützung der natürlichen Induktion), bereits erfolgreich eingesetzt wurde, wird durch die hier fehlende Induzierbarkeit der spezifischen m-RNA bzw. die mangelnde Synchronisierung der Pflanzenzellen erschwert.

Die Klonierung mit Hilfe von genomischen Genbibliotheken ist schwer kalkulierbar, da keine Abschätzungen der Genomgröße vorliegen. Die erreichten Ausbeuten an Rekombinanten reichen zur Repräsentierung von kleineren Genomen eukaryotischer Organismen wie Kaninchen oder Fruchtfliege (MANIATIS et.al. (1978)) ohne weiteres aus, für ein Pflanzengenom sind sie unter ungünstigen Verhältnissen, d.h. Genome weit größer als das menschliche, um ein bis zwei Größenordnungen zu niedrig.

Die Ursache für diese Unwägbarkeit liegt in dem hohen Anteil von bis zu 85 % repetitiver, nicht codierender Sequenzen in Pflanzengenomen. Neun von zehn Rekombinanten repräsentieren diese Regionen, sind aber für die Suche nach dem Gen eines Enzyms des Sekundärstoffwechsels ohne Bedeutung.

Die in den folgenden Kapiteln beschriebene Methode beruht auf der Überlegung, daß die Spaltung von Pflanzen-DNA mit Restriktionsenzymen auf Grund der Eigenheiten dieser Genome nicht zu einer statistischen Längenverteilung der DNA-Fragmente führt.

Die 80 % des Genoms, die aus repetitiven Sequenzen bestehen, die oft mehrere tausend Mal wiederholt sind (MURRAY et.al. (1978)), ergeben bei einer Restriktion nur eine relativ kleine Zahl von Fragmenten unterschiedlicher Länge, von denen aber jedes einzelne sehr oft vorkommt.

Folgende überschlagsmäßige, stark vereinfachende Rechnung soll das verdeutlichen.

Ein Pflanzengenom von 10^7 kb Größe besteht zu 8×10^6 kb aus repetitiven Sequenzen und aus 2×10^6 kb codierenden Regionen. Die Restriktion der codierenden Bereiche verläuft statistisch. Aus 2×10^6 kb DNA entstehen 2×10^6 Fragmente mit statistischer Längenverteilung.

Die Restriktion der repetitiven Bereiche verläuft nicht statistisch. Unter der Annahme, daß jedes repetitive Element durchschnittlich 1000-mal wiederholt auftritt (MURRAY et.al. (1978), FLAVELL (1982)) entstehen aus 8×10^6 kb DNA 8×10^3 Fragmente mit statistischer Größenverteilung, von denen jedes 1000-mal auftritt.

Wird der gesamte Restriktionsansatz einer Gelelektrophorese unterzogen, die nach der Größe der DNA-Moleküle auftrennt, so laufen alle 1000 Einzelfragmente einer repetitiven Sequenz an derselben Stelle.

Aus dem Gel wird anschließend der DNA-Längenbereich eluiert, in dem das hybridisierende Fragment auftritt. Werden dabei beispielsweise 5 % der gesamten, durch die Gelelektrophorese hergestellten Größenverteilung extrahiert (bei normalen Agarosegelen bedeutet das z.B. einen 1 kb breiten DNA-Längenbereich, da Fragmente bis zu mindestens 20 kb noch sehr gut getrennt werden können), so werden bei diesem Schritt sowohl 5 % der DNA-Fragmente aus den codierenden Regionen eluiert, d.h. 10^5 von den 2×10^6 Fragmenten unterschiedlicher Länge, als auch 5 % der DNA-Fragmente aus den repetitiven Regionen, d.h. 400 von 8×10^3 Fragmenten unterschiedlicher Länge, aber jedes davon in 1000-facher Kopie.

Für die weitere Rechnung nehmen wir ohne Einschränkung der Allgemeinheit an, daß der selektierte Größenbereich eine durchschnittliche Fragmentlänge von 1 kb hat.

Dieses vorselektierte DNA-Fragmentegemisch wird nun erneut einer Restriktion unterzogen. Von Vorteil ist, wenn für diese Restriktion ein Enzym verwendet werden kann, das im hybridisierenden DNA-Fragment nicht schneidet, was durch Voruntersuchungen immer zu finden ist.

Ein "Sechser"-Enzym findet auf einem beliebigen DNA-Stück von 1 kb Länge im Durchschnitt eine Schnittstelle. Oder: Nur jedes 1000-ste DNA-Fragment des selektionierten Größenbereichs wird nicht gespalten.

Unsere gröbenselektionierte DNA-Fraktion der Modellrechnung setzt sich aus 400 unterschiedlichen Fragmenten á 1000 Kopien,

die den repetitiven Regionen entstammen, und 10^5 Fragmenten aus den codierenden Bereichen zusammen.

Bei der zweiten Restriktion besteht also eine hohe statistische Wahrscheinlichkeit, daß alle 400 unterschiedlichen Fragmente aus den repetitiven Regionen eine Schnittstelle für dieses Enzym enthalten, gespalten werden, und mit ihnen jeweils ihre 1000 Kopien.

Von den 10^5 Fragmenten aus den codierenden Regionen bleiben nach der Statistik etwa 100 ungeschnitten. Wenn wir unser Enzym so gewählt haben, daß das hybridisierende Fragment keine Schnittstelle des zweiten Enzyms enthält, gehört es zu den wenigen unveränderten.

Die Fragmente, die eine Restriktionsschnittstelle enthielten, werden entweder bei der nachfolgenden Größenselektion durch Gelelektrophorese entfernt (analog zu oben), oder, wenn die Schnittstelle sehr peripher lag, bei der Klonierung eliminiert. Wird der Vektor mit dem Enzym der ersten Restriktion für die Ligation der Fremd-DNA vorbereitet, sind DNA-Fragmente, die in der zweiten Restriktion zwar geschnitten wurden, aber nach der erneuten Größenselektion noch enthalten sind, nicht klonierbar, da sie mindestens eine nicht kompatible Endsequenz haben.

Rein statistisch wären bereits nach diesem Schritt alle repetitiven Sequenzen eliminiert und aus den Fragmenten der codierenden Regionen eine so kleine Teilmenge ausgewählt, daß das hybridisierende gesuchte DNA-Fragment durch "Screening" der Einzelklone leicht zu isolieren wäre.

Diese modellhafte Rechnung mußte jedoch stark vereinfachen, sie sollte auch nur der Illustrierung der Strategie dienen.

In der Praxis sind nach den einzelnen Restriktionen und Größenselektionen Zwischenklonierungen nötig, um die DNA-Menge zu erhöhen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Selektionsschritte und ein anschließendes Screeningverfahren für die Isolierung hybridisierender Klone gekoppelt.

Die wesentlichen Punkte der Anreicherungs-methode seien hier noch einmal zusammengestellt:

- Restriktionen überführen hoch repetitive DNA-Regionen in weniger als 1 % der sich bei statistisch liegenden Schnittstellen ergebenden Zahl unterschiedlicher Fragmente.
- Durch wiederholte Restriktionen und Größenfraktionierungen werden sukzessiv aus dem, durch Hybridisierungsexperimente selektierten DNA-Größenbereich, andere comigrierende, aber differente Restriktionsmuster aufweisende DNA-Fragmente abgetrennt, die hybridisierenden also angereichert.

Da nur Restriktionsmuster und die Länge der resultierenden Fragmente, nicht aber deren Häufigkeit für die Selektion relevant sind, werden hoch repetitive DNA-Bereiche wirkungsvoll entfernt.

- Bereits geringe DNA-Mengen des zu untersuchenden Genoms reichen für die Durchführung des Anreicherungsverfahrens aus, da durch die Zwischenklonierungen schon nach dem ersten Zyklus mit leicht zu vermehrender und isolierender prokaryontischer DNA gearbeitet wird.

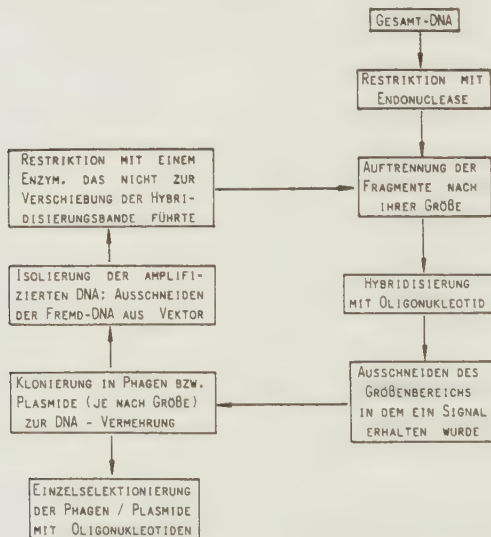


Abb. 80 Anreicherungsverfahren zur Isolierung von Genen aus Genomen mit einem hohen Anteil repetitiver Sequenzen

13.1 Hybridisierung von DNA aus R. serpentina mit verschiedenen Oligonukleotidgemischen

Die verwendeten 20-mer Oligonukleotidgemische HA4 und HA5 (vgl. Seite 187) leiten sich von ein und derselben Aminosäuresequenz ab. Je 32 mögliche DNA-Sequenzen wurden in einem Gemisch zusammengefaßt. Dies war ein guter Kompromiß zwischen möglichst großer Länge und niedriger Varianz jedes Gemisches.

Um beurteilen zu können, welches der beiden Oligonukleotidgemische die gesuchte Sequenz enthält, wurden zwei identische Gele mit EcoRI-gespaltener DNA aus R. serpentina mit den beiden Gemischen HA4 und HA5 unter identischen Bedingungen hybridisiert.

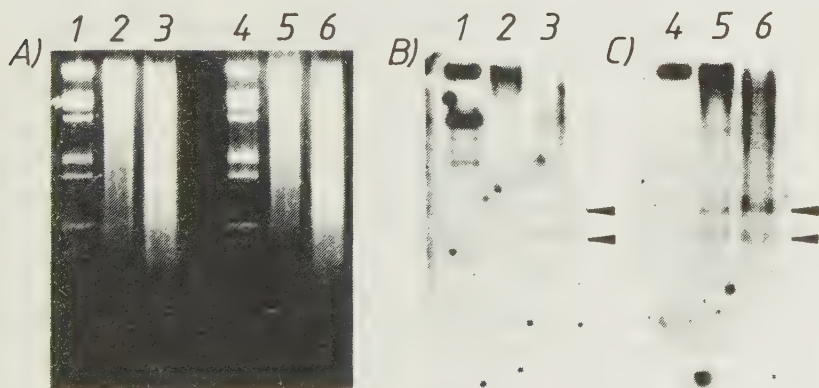


Abb. 81 Vergleich der beiden Oligonukleotidgemische HA4 und HA5 in Hybridisierungen mit EcoRI-gespaltener DNA aus R. serpentina

A) 0.8 % Agarosegel

1 u. 4) EcoRI/HindIII gespaltene Lambda-DNA (Größenstandard)

2 u. 5) EcoRI-Restriktion von Tina30-DNA

3 u. 6) EcoRI/HindIII-Restriktion v. Tina30-DNA

B u. C) Autoradiogramme der Hybridisierungen der beiden Hälften des Gels aus Abb. A mit den beiden Oligonukleotidgemischen

B) HA4 (Spur 1 - 3)

C) HA5 (Spur 4 - 6)

Hybridisierungstemperatur : 37°C

Exposition : -70°C / 12 h

8-fach Verstärkerschirm

In beiden Autoradiogrammen sind auf gleicher Höhe (Pfeile in Abb. 81) zwei Banden von ca. 800 bp und 1100 bp Länge zu erkennen, die bei Hybridisierung mit HA5 deutlich intensiver sind als beim Oligonukleotidgemisch HA4.

Auf Grund dieses Resultates wurde für alle weiteren Experimente das Oligonukleotidgemisch HA5 verwendet.

Für die Anreicherungsprozedur ist von Bedeutung, daß beide Banden sowohl in Spur 5 und 6 die gleiche Position haben. Das bedeutet, daß die hybridisierenden EcoRI-Fragmente keine HindIII Schnittstelle enthalten. Das Enzym HindIII ist also für einen zweiten Anreicherungs-schritt, wie in Abbildung 80 schematisch dargestellt, geeignet.

13.2 Hybridisierung von DNA aus Pflanzen verschiedener Familien mit dem Oligonukleotidgemisch HA5

Um die Spezifität des mit HA5 erhaltenen Hybridisierungssignals zu beweisen, wurden DNA-Präparationen aus Pflanzen verschiedener Familien, analog dem in Abbildung 81 gezeigten Experiment, nach Restriktion mit EcoRI und Agarosegelelektrophorese, mit diesem Gemisch hybridisiert.

Die verwendeten DNA-Präparationen entstammten Geweben aus Zellsuspensionskulturen die einheitlich 10 Tage in LS-Medium angezogen worden waren.

Folgende Kulturen wurden getestet:

Tina30	<u>R. serpentina</u>	Apocynaceae
Rosa	<u>R. canina</u>	Rosaceae
SR28	<u>C. roseus</u>	Apocynaceae
B.wil.	<u>B. wilsoniae</u>	Berberidaceae

Die beiden Zellkulturen Tina30 und SR28 enthalten nachweislich Strictosidinsynthase (vgl.: Tina30 : diese Arbeit ; SR28 : PFITZNER (1984)). Auf Grund der engen Verwandtschaft der beiden Stammpflanzen wird eine hohe Homologie der Enzyme bzw. ihrer Gene erwartet.

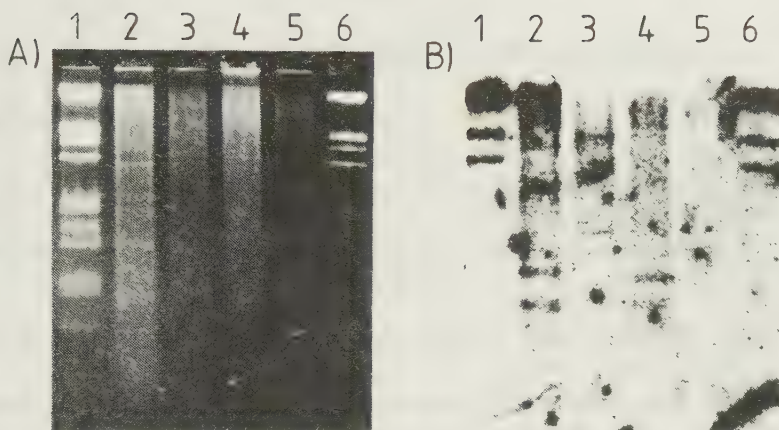


Abb. 82 Hybridisierung von DNA aus Pflanzen verschiedener Familien mit Oligonukleotidgemische HA5

A) 0.8 % Agarosegel

1) EcoRI/HindIII-Restriktion von Lambda-DNA (Größenstandard)

2 - 5) DNA aus Zellsuspensionsgewebe der angegebenen Kulturen

2) 12 µg Tina30 R. serpentina

3) 10 µg Rosa R. canina

4) 12 µg SR28 C. roseus

5) 9 µg B.wil. B. wilsoniae

B) Autoradiogramm der Hybridisierung der aus Gel A auf Nitrocellulose transferierten DNA mit dem Oligonukleotidgemisch HA5

Hybridisierungstemperatur : 37°C

Exposition : -70°C / 48 h
8-fach Verstärkerschirm

Die DNA aus den beiden Kulturen Tina30 und SR28 zeigt das gleiche Hybridisierungsmuster, jeweils zwei Banden, das mit dem in Abbildung 81 gezeigten übereinstimmt.

B. wilsoniae (Spur 5) reagiert nicht mit HA5, bei DNA aus Rosa canina hingegen ist eine Bande von etwa 5000 bp Länge zu beobachten.

Die Übereinstimmung der Hybridisierungsmuster zwischen der DNA aus R. serpentina und der aus C. roseus gab den letzten Anstoß, sich bei dem Anreicherungsverfahren auf diesen Bereich zu konzentrieren.

13.3 Präparation von Pflanzen-DNA Fragmenten

EcoRI gespaltene DNA aus Tina30 wurde in einem 0.8% Agarosegel größenselektioniert. Um genügend DNA-Fragmente auftrennen zu können, mußten die einzelnen Spuren überladen werden. Da dies zu beachtlichen Verzerrungen des Laufverhaltens führt, mußte der für die Klonierung eingesetzte Größenbereich der DNA-Fragmente großzügig gewählt werden.

Die hybridisierenden Banden entsprachen einer Länge von 800 und 1100 bp.

Mit Hilfe von DEAE-Membranen (vgl. Seite 62) wurde der Bereich von 500 - 1500 Basenpaaren extrahiert.

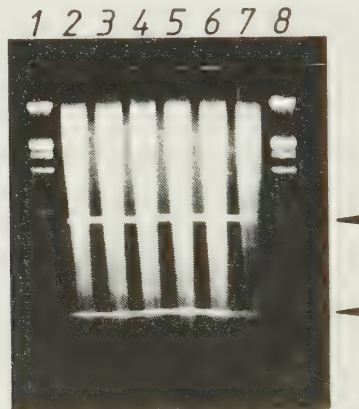


Abb. 83 Präparation der EcoRI-Fragmente der DNA aus Tina30 des Größenbereichs 500 - 1500 bp.

0.8 % Agarosegel

1 u. 8) EcoRI/HindIII-Restriktion v. Lambda-DNA (Größenstandard)

2 - 7) je 30 µg EcoRI-gespaltenen DNA aus Tina30 Zellkultur von R. serpentina

Die in das Gel eingefügten DEAE-Membranstreifen (markiert durch Pfeile) dienen zur Extraktion der zwischen den Membranen liegenden DNA-Fragmente

16 µg DNA konnten von der unteren DEAE-Membran (Abb. 83A) eluiert und für die Klonierung weiterverwendet werden.

13.4 Klonierung der DNA-Fragmente aus R. serpentina mit pUC19 - Plasmidvektor

Es wurde der Plasmidvektor pUC19 verwendet, da sich sein Klonierungsbereich sehr gut mit dem relevanten Größenbereich der Pflanzen DNA-Fragmente von 0.5 - 1.5 kb Länge deckt.

Er ist kommerziell erhältlich (1) oder kann, wie auf Seite 75 beschrieben, präpariert werden.

13.4.1 Vorbereiten des Plasmidvektors

Die Pflanzen-DNA Fragmente entstammten einer EcoRI-Restriktion und sollten deshalb in die EcoRI-Schnittstelle des Polylinkers des pUC19 - Plasmids kloniert werden.

EcoRI-Restriktion von pUC19

30 µl pUC19 - DNA (0.2 µg/ µl)
4 µl 10x EcoRI-Puffer (2)
1 µl EcoRI-Endonuclease (9 U/µl)
5 µl Aqua bidest.

1 h bei 37°C inkubieren

Entfernen des Restriktionsenzym

ad 225 µl Aqua bidest.

25 µl 4 M LiCl

1 x Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahieren

1 x Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahieren

750 µl Ethanol abs. zusetzen

10 min Ethanol/Trockeneisbad

15 min bei 4°C und 15000 g (3) abzentrifugieren

Überstand abnehmen und Pellet mit 1 ml 70% Ethanol waschen
DNA im Vakuum trocknen (4)

(1) BOEHRINGER MANNHEIM
(2) entsprechend den Angaben des Herstellers
(3) EPPENDORF, Zentrifuge 5414
(4) SAVANT, Speed Vac Concentrator

Um die Religationsrate der pUC - Plasmide zu senken, wurden durch Phosphatasebehandlung die 5'-ständigen Phosphatgruppen des Plasmid-DNA-Stranges entfernt.

Phosphatasebehandlung

DNA-Pellet in 45 µl Aqua bidest. aufnehmen

- 5 µl 10x CIP-Puffer (1)
- 1 µl CIP-Verdünnung 1:3 (2)
- 30 min / 37°C
- 1 µl CIP-Verdünnung 1:3
- 30 min / 37°C
- 1 µl CIP-Verdünnung 1:3
- 30 min / 37°C

Entfernen der Phosphatase

zu obigem Ansatz zusetzen

- 40 µl Aqua bidest.
- 10 µl 10x STE (3)
- 5 µl 10% Natriumdodecylsulfat
- 15 min / 68°C

2 x Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahieren

1 x Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahieren

300 µl Ethanol abs. zusetzen

fällen, waschen, trocknen (wie oben)

13.4.2 Ligation der Pflanzen-DNA mit der Vektor-DNA und Transformation in E. coli JM105

Für die Klonierung muß die EcoRI geschnittene Pflanzen-DNA mit den Phosphatase behandelten EcoRI-Enden der Plasmid-DNA ligiert werden.

Das Plasmid-DNA Pellet in 20 µl Aqua bidest. aufnehmen.

- (1) 500 mM Tris/HCl pH 8.0 / 1 mM EDTA
- (2) BOEHRINGER MANNHEIM, alkalische Phosphatase aus Kälber-
darm (Best.-Nr.: 713 023)
- (3) 100 mM Tris/HCl pH 8.0 / 10 mM EDTA / 1 M NaCl

Ligationsansatz

20 µl Plasmid-DNA (4 µg)

100 µl Pflanzen-DNA (10 µg)

14 µl 10x Ligationspuffer (vgl. MANIATIS et.al. (1982))

6 µl T4-DNA-Ligase

Ligation : 16 h bei 14°C

Der Ligationsansatz wird vor Zusatz der T4-DNA-Ligase für 5 min auf 68°C erwärmt, um die Schnittstellen der Vektor- und Pflanzen-DNA aufzuschmelzen, und dann auf 14°C abgekühlt.

Transformation von JM105-Zellen

Mit der DNA-Lösung werden kompetent gemachte E. coli JM105 - Zellen transformiert.

Die Präparation von kompetenten Zellen nach COHEN et.al. (1972) und die Durchführung der Transformationen sind auf Seite 78 ausgeführt.

Der Ligationsansatz wird in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und mit 110 µl Aqua bidest. auf 250 µl aufgefüllt.

Pro Transformation wurden 25 µl des Ligationsansatzes und 200 µl kompetente Zellen eingesetzt.

13.5 Isolierung von Rekombinanten, die mit dem Oligonukleotidgemisch HA5 hybridisieren

Von den einzelnen Transformationsansätzen werden Übernachtskulturen angelegt, um die DNA-Menge zu erhöhen, daran schließt sich die Isolierung der hybridisierenden Rekombinanten an.

13.5.1 Übernachtskulturen der Transformationsansätze und Isolierung der Plasmid-DNA

Mit jedem der Transformationsansätze wird ein 100 ml Erlenmeyerkolben angeimpft, der 10 ml LB-Medium mit 200 µg/ml Ampicillin enthält.

Über Nacht wächst das Transformantengemisch bei 37°C in einem Schüttelinkubator (1) bis zur stationären Phase. Aus 1.5 ml dieser Übernachtskultur wird nach der Methode von BIRNBOIM (1979) die Plasmid-DNA isoliert.

Eine Arbeitsanleitung für dieses Verfahren ist auf Seite 74 dargestellt.

Die isolierte Plasmid-DNA wird geteilt. Eine Hälfte wird für die Hybridisierungsexperimente zur Bewertung der Transformationsansätze eingesetzt, die andere Hälfte wird bei -20°C gelagert, um für die weitere Selektion verwendet werden zu können.

13.5.2 Selektion der Transformationsansätze, die hybridisierende Klone enthalten

Durch Restriktion mit EcoRI gewinnt man die aus den Vektormolekülen ausgeschnittenen klonierten DNA-Fragmente zurück.

Die Restriktionsansätze der Übernachtskulturen der Transformationen wurden in einem 0.8 % Agarosegel aufgetrennt, die DNA auf Nitrocellulose transferiert ("Southern-Blot", vgl. MANIATIS et.al. (1982)) und mit dem Oligonukleotidgemisch HA5 hybridisiert.

Eine ausführliche Arbeitsanleitung für eine modifizierte "Southern-Blot"-Methode und die Beschreibung einer optimierten Hybridisierungstechnik ist auf den Seiten 65 und 83 wiedergegeben.

In Abbildung 84 ist zu sehen, daß die Transformationsansätze 2, 5 und 10 hybridisierende DNA-Fragmente enthalten.

Die absolute Schwärzung der Banden kann nicht zur Bewertung herangezogen werden, da unterschiedliche DNA-Mengen mit unbekanntem Anteil der hybridisierenden Fragmente in die Elektrophorese eingesetzt worden sind.

(1) z.B. NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC
Gyrotory Water Bath Shaker, Model G76

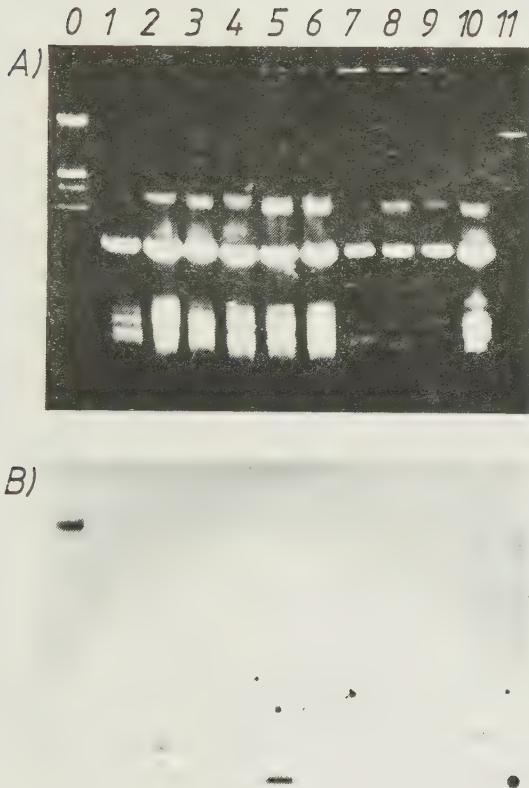


Abb. 84 Hybridisierung der klonierten DNA-Fragmente aus den Plasmidpräparationen mit dem Oligonukleotidgemisch HA5

A) 0.8 % Agarosegel

0 u. 11) HindIII-Restriktion von Lambda-DNA
(Größenstandard)

1 - 10) EcoRI gespaltene Plasmid-DNA aus den
Transformationsansätzen 1 - 10

B) Autoradiogramm des zugehörigen Nitrocellulose-
filters nach Hybridisierung mit dem Oligonukleo-
tidgemisch HA5

Hybridisierungstemperatur : 37°C

Waschtemperaturen : 37°C, 40°C, 42°C

Das Foto zeigt das Autoradiogramm nach dem 42°C
Waschschritt

13.5.3 Anreicherung der Rekombinanten mit hybridisierenden DNA - Sequenzen

Zur Anreicherung der hybridisierenden DNA-Fragmente wurde mit der präparierten Plasmid-DNA der Transformationen 2 und 10 wie folgt verfahren:

EcoRI-Restriktion

Die klonierten DNA-Fragmente werden aus den Vektormolekülen ausgeschnitten.

HindIII-Restriktion

Die hybridisierenden Banden wurden durch die EcoRI/HindIII-Doppelrestriktion gegenüber denen der nur mit EcoRI geschnittenen DNA nicht verschoben (Abb. 81). Diese hybridisierenden EcoRI-Fragmente enthalten also keine HindIII-Schnittstellen. Viele andere DNA-Fragmente aus dem Pflanzengenom, die nach EcoRI-Restriktion ähnliche oder gleiche Länge hatten und mit kloniert wurden, haben aber irgendwo zwischen den EcoRI-Schnittstellen eine HindIII-Sequenz und werden durch diese Restriktion zerschnitten.

Zum einen ändert sich dadurch ihre Länge, sie werden also bei der Größenselektion in der Gelelektrophorese abgetrennt, zum anderen haben die erzeugten Fragmente an einem oder an beiden Enden HindIII-Sequenzen und können, auch wenn sie noch im DNA-Gemisch enthalten sind, damit nicht mehr in die EcoRI-Schnittstelle des pUC19-Polylinkers kloniert werden.

Agarosegelelektrophorese

Die Fragmente der mit beiden Restriktionsenzymen gespaltenen Plasmid-DNA werden in einem 0.8 % Agarosegel aufgetrennt und, wie oben beschrieben, der Größenbereich von 500 bp bis 1500 bp extrahiert.

Ligation, Transformation und Übernachtskultur

Nach Ligation der eluierten DNA-Fragmente mit EcoRI-geschnittener und Phosphatase behandelter pUC19-DNA und Transformation,

wiederum in zehn aliquoten Teilen, werden die Transformanten in einer Übernachtskultur vermehrt.

Plasmidpräparation, Restriktion und Hybridisierung

Aus 1.5 ml dieser Übernachtskulturen wird die Plasmid-DNA extrahiert und in zwei Hälften geteilt. Die eine wird bei -20°C gelagert, die andere in eine Restriktion mit EcoRI eingesetzt. Die DNA-Fragmente werden in einem 0.8%-Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit dem Oligonukleotidgemisch hybridisiert. Die positiv reagierenden Transformationsansätze werden für die weitere Isolierung der hybridisierenden Klone verwendet.

Nach diesem Anreicherungsschritt reagierten vier Teiltransformationen des Ansatzes 2 und drei des Ansatzes 10 des ersten Selektionsschrittes bei der Hybridisierung positiv.

13.5.4 Isolierung der Rekombinanten mit hybridisierenden DNA - Bereichen

Je eine der Plasmidpräparationen der Transformation 2 und eine der Transformation 10, die nach dem ersten Anreicherungsschritt Hybridisierung zeigten, wurden zusammen mit der Transformation 5, die keiner weiteren Vorselektion unterzogen worden war, in gleicher Weise weiterbearbeitet.

Retransformation

Mit jeweils 5 % der aufbewahrten Plasmid-Präparationen der beiden angereicherten und des nicht vorselektierten Transformationsansatzes wurden ohne weitere Reinigung oder Vorbereitung, kompetente Zellen des Stammes JM105 transformiert. Nach Plattieren der Ansätze auf IXA-Platten (vgl. Seite 73) von 24 x 24 cm Größe und Bebrüten über Nacht bei 37°C hatten die transformierten E. coli-Zellen gut sichtbare, circa 1 mm große, überwiegend einzeln liegende Kolonien gebildet.

Separierung der Rekombinanten

Nach dem Bebrüten sind die Bakterienkolonien auf dem Agar zu erkennen. Alle wachsenden Kolonien tragen Plasmide, die für die

Ampicillinresistenz verantwortlich sind. Bei Rekombinanten ist durch die Insertierung der Fremd-DNA die Funktion der von lacZ codierten β -Galaktosidase zerstört. Sie unterscheiden sich durch ihre weiße Farbe von den blau gefärbten Transformanten ohne Fremd-DNA.

Der Anteil der Rekombinanten schwankte bei den einzelnen Transformationen im Bereich von 20 - 30% der Kolonien.

Die weißen Kolonien werden mit sterilen Zahnstochern schachbrettartig auf 24 x 24 cm großen Petrischalen strichförmig angeimpft ("gegrittet") und über Nacht bei 37°C bebrütet. Pro Reihe können 30 Einzelkolonien aufgetragen werden.

Isolierung von einzelnen hybridisierenden Klonen

Mit einer Impföse wird von den angewachsenen strichförmigen Bakterienkolonien je ein Drittel abgenommen und damit ein 250 ml Erlenmeyerkolben mit 25 ml LB-Medium und 200 μ g/ml Ampicillin beimpft.

Die Kolonien aus je drei Zeilen werden in einer Übernachtskultur vereinigt (3 Zeilen á 30 Kolonien = 90 Klone). Mit den Spalten verfährt man analog. Jede einzelne Kolonie kommt dadurch einmal in den Übernachtskulturen der Spalten und einmal in denen der Zeilen vor. Hybridisierende Kulturen liegen also am Kreuzungspunkt einer positiven "Zeilenkultur" und einer positiven "Spaltenkultur".

Zum "Screenen" einer IXA-Platte mit 900 Kolonien werden bei diesem Verfahren nur 20 einzelne Übernachtskulturen benötigt.

Wie bereits oben beschrieben, wird aus diesen die Plasmid-DNA isoliert, einer Restriktion mit EcoRI unterzogen, in einem Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit dem Oligonukleotidgemisch hybridisiert.

Mit einem Schritt engt man so den Kreis von 900 auf die 9 Kolonien im Kreuzungspunkt ein. Von diesen werden im Anschluß einzelne Plasmidpräparationen gemacht und der positive wiederum durch eine Hybridisierungsreaktion identifiziert.

In den angereicherten Transformantengemischen 2 und 10 wurden jeweils acht positive Klone gefunden, von denen je einer ausgewählt wurde. Die Einzelselektion des Transformationsansatzes 5 erbrachte nur eine positive Kolonie.

Vereinzelung und Verifizierung

Als positiv identifizierte Kolonien wurden auf IXA-Platten ausgestrichen und vereinzelt. Nach Vermehrung von je sechs einzeln liegenden Kolonien jedes selektierten Klon wurde mit einem Teil des Bakterienrasens die obige Prozedur mit Übernachtkultur, Plasmidpräparation, Restriktion, Elektrophorese und Hybridisierung wiederholt.

Bei den je sechs einzeln getesteten Klonen der drei positiven Kolonien fand sich jeweils ein Klon, der nicht hybridisierte.

Nur durch die Vereinzelung und diesen zusätzlichen Testzyklus ist sichergestellt, daß Reinkolonien vorliegen. Verunreinigungen durch einen geringen Anteil DNA aus anderen Klonen würden beim Sequenzieren der DNA-Fragmente stören, da sie zu sogenannten "Nebensequenzen" führen können.

Ergebnis

Aus den insgesamt 10 Transformationsansätzen, die zusammen etwa 8000 Rekombinante enthielten, wurden 17 in den Hybridisierungsreaktionen positiv reagierende Klone isoliert.

Da jeweils acht in einem einzigen Transformationsansatz nach Durchführung des Anreicherungs-schrittes zu finden waren, wurde davon ausgegangen, daß es sich um identische Klone handelte. Diese Annahme war auch auf die Beobachtung gestützt, daß aus dem Transformationsansatz 5, der nicht weiter angereichert worden ist, nur ein einziger positiver Klon isoliert werden konnte.

Für die Statistik bedeutet das, daß drei unterschiedliche positive Klone aus 8000 getesteten isoliert wurden.

Aus Zeitgründen konnte jeweils nur ein positiver Klon der angereicherten Transformationsansätze und der hybridisierende Klon des nicht angereicherten Ansatzes weiter untersucht und deshalb die Korrektheit der Annahme nicht überprüft werden.

13.6 Sequenzierung der isolierten Klone

Die Kurzbezeichnungen dieser Klone, die auch hier verwendet werden sollen, ihre Selektionskriterien und die Nummer des Transformationsansatzes, aus dem sie isoliert wurden, sind in Tabelle 17 zusammengestellt.

Bezeichnung	Transformations-Nr.	Größenselektion	
		EcoRI	HindIII
A132	5	+	-
D923	2	+	+
H109	10	+	+

Tab. 17 Bezeichnungen, Herkunft und Selektionskriterien der zu sequenzierenden Klone

Die Kürzel für die Bezeichnung der Klone leiteten sich aus den Positionen dieser Klone auf den für die Einzelselektionierung verwendeten Petrischalen ab.

13.6.1 Präparative Plasmidisolierung

Um genügend DNA-Material hoher Reinheit, wie es für die Sequenzierung benötigt wird, zur Verfügung zu haben, wurden die isolierten Klone in 2 l Erlenmeyerkolben vermehrt und die Plasmid-DNA isoliert.

Die Präparation der Plasmide geschah nach der von CLEWELL und HELINSKI (1969) beschriebenen Methode.

Eine Arbeitsanleitung mit leichten Modifikationen dieses Verfahrens ist auf Seite 75 ff wiedergegeben.

13.6.2 Sequenzieren der klonierten DNA-Fragmente

Die klonierten DNA-Fragmente haben, sofern nur ein Fragment pro Vektormolekül bei der Ligation insertiert wurde, eine Länge von 500 bis 1500 Basenpaaren.

Da die hybridisierende Region von primärem Interesse ist, wird die Position dieser Sequenz in dem Fragment bestimmt, um dann gezielt diesen Bereich sequenzieren zu können.

13.6.2.1 Erstellen der Restriktionskarten

Zur Erstellung der Restriktionskarten werden einige Endonucleasen ausgewählt und mit ihnen die Plasmid-DNA, pUC19-DNA plus kloniertes Fragment gespalten und die Fragmente in Agarosegelele aufgetrennt.

Es muß berücksichtigt werden, daß auch die Fragmente der pUC19-DNA in diesem Gemisch enthalten sind. Der vollständigen Restriktionanalyse von pUC19 von ROBERTS (1984) können die Positionen dieser Schnittstellen entnommen werden.

Aus der Länge und der Zahl der DNA-Fragmente, die bei Restriktionen mit den verschiedenen Endonucleasen entstehen, wird die Restriktionskarte errechnet.

Zusätzlich wurden die DNA-Fragmente nach ihrer Auftrennung in Agarosegelele auf Nitrocellulose transferiert und mit dem Oligonukleotidgemisch HA5 hybridisiert.

Aus dem Vergleich der im Agarosegel sichtbaren Banden und den im Autoradiogramm auftretenden läßt sich die Position der hybridisierenden Region relativ zu den berechneten Restriktionschnittstellen bestimmen.

Dadurch ist es möglich, gezielt Schnittstellen zu beiden Seiten des hybridisierenden Bereichs auszuwählen, die für die Sequenzierung dieser Region verwendbar sind.

In Abbildung 85 ist dieses Verfahren am Beispiel des Klons D923 demonstriert.

Die daraus abgeleiteten Restriktionskarten sind in Abb. 86 zusammengestellt. Die Positionen der Schnittstellen sind im Rahmen der Ablesegenauigkeit angegeben, die hybridisierenden Bereiche verstärkt gezeichnet.

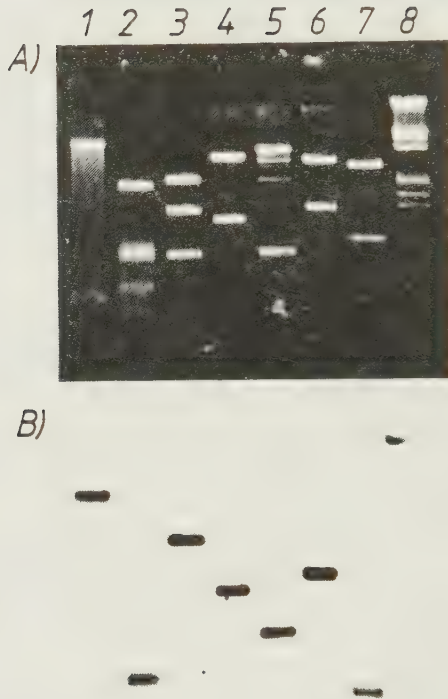


Abb. 85 Lokalisieren des hybridisierenden Bereichs der klonierten DNA-Fragmente

A) 0.8 % Agarosegel

1 - 7) Restriktionsprodukte der Spaltung von je 2.5 µg Plasmid-DNA mit den angegebenen Endonucleasen

- 1) Sac I
- 2) Rsa I
- 3) Dra I
- 4) Nde I
- 5) Asp 718
- 6) EcoRI
- 7) Nde I x Asp 718

8) EcoRI/HindIII - Restriktion von Lambda-DNA (Größenstandard)

B) Autoradiogramm des Nitrocellulosefilters zu A) nach Hybridisierung mit Oligonukleotidgem. HA5

Hybri.temp. : 37°C Waschtemp. : 42°C

Exposition : 1 h / -70°C / 8-fach Verstärk.

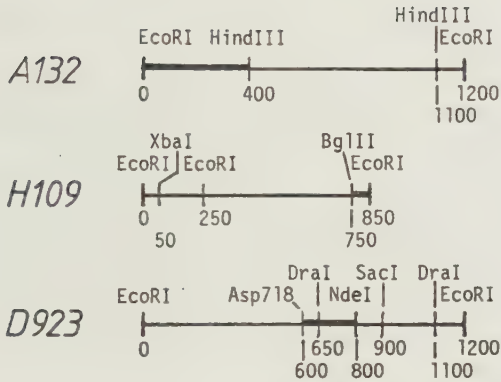


Abb. 86 Restriktionskarten für die Sequenzierung der isolierten Klone
 (die ermittelten Regionen der Hybridisierung sind verstärkt gezeichnet)

13.6.2.2 Sequenzanalyse der klonierten DNA - Fragmente und Identifizierung der Hybridisierungsstelle

Die Sequenzreaktionen wurden nach der Methode von MAXAM und GILBERT (1980) durchgeführt (vgl. Seite 86 ff).

Die Abbildungen 88 - 90 geben die ermittelten Sequenzen mit der vollständigen Restriktionsanalyse dieser Bereiche wieder.

Zur Identifizierung der genauen Hybridisierungsstelle wurde ausgenutzt, daß das Oligonukleotidgemisch HA5 eine HaeIII-Schnittstelle enthält.



Abb. 87 Sequenz des Oligonukleotidgemisches HA5 mit hervorgehobener HaeIII - Schnittstelle

Die in den analysierten DNA-Sequenzen gefundenen HaeIII - Schnittstellen stellen potentielle Hybridisierungspunkte der Oligonukleotide dar.

Zur sicheren Identifizierung der Hybridisierungssequenzen dienten zwei Kriterien:

- 1) Die sich errechnenden Schmelztemperaturen bei mehr als einem möglichen Sequenzbereich.

Die Schmelztemperatur muß mindestens so hoch wie die Waschtemperatur bei der Hybridisierung sein.

- 2) Die Zerstörung der Hybridisierungsmöglichkeit durch Spalten des DNA-Fragmentes an der postulierten Stelle

Res. enzyme map for #5:A132.TEXT

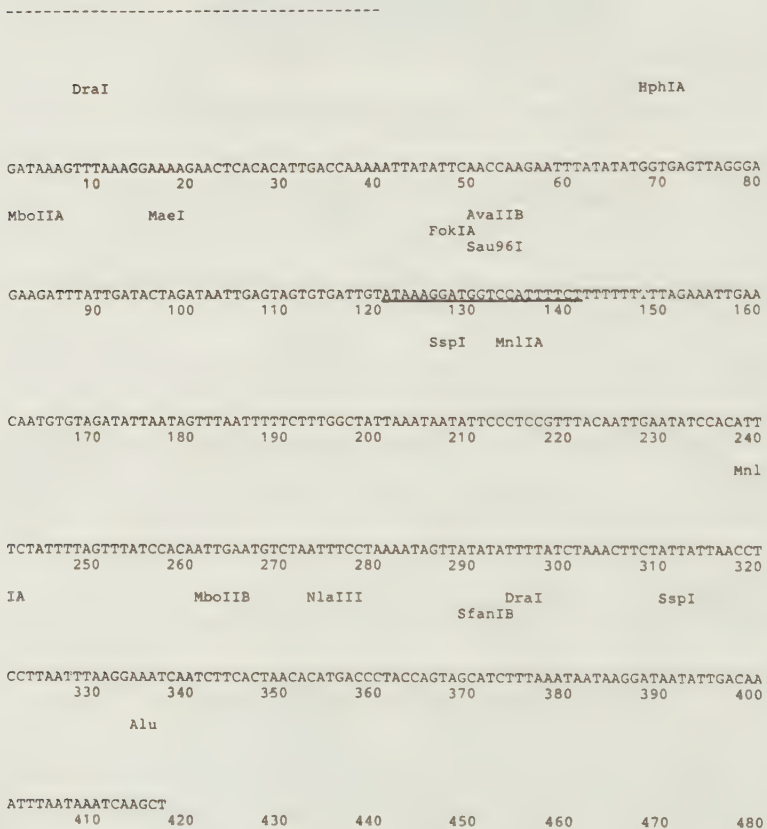


Abb. 88 Sequenzanalyse des Klon A132
(die Hybridisierungsstelle ist unterstrichen)

Res. enzyme map for #5:H109.TEXT

```

MnlIB  AwaIARsaI  AluI  EcoRI                HaeIII  MboI
BamHI  BanII  BanIIB
MboI  HpaII  HgiBI
NlaIV  KpnI  SacITaqI
XhoIIA  sI  I  IV
AGAGGATCCCCGGGTACCCGAGCTCGAATCCCATAAATAGATGCCGGTTTGATCTTTTGGAAACAATCTGATGAATTTAGT
      10      20      30      40      50      60      70      80

BglII  HaeIII  MboI  RsaI  HaeII
MboI  MnlIB  Sau96I  TaqI  Ma

AGATCTTTTAGGAGGCCCTAATGACTATAGATCGAACCTATCCAAATTTTACAGTACGATGGTTGGCTGTTACGGCCT
      90      100      110      120      130      140      150      160

AluIRsaI  MboI  FokIB
I
eI

AGCTGTACCTACCGTCTTTTTTTGGGATCAATATCAGCAATGCAGTTCATCCAACGATAAACCTATATCGCAATTATAG
      170      180      190      200      210      220      230      240

AluI  HinfIRsaI

AGCTATGACACAATCAAACCCGAACGAACAAAATGTTGAATTGAATCGTACCAGTCTATACTGGGGTTATTACTATT
      250      260      270      280      290      300      310      320

RsaI  MboIIB  Ss

TTGTACTTGCTGTTTTATTTTCCAATTATTTCTTCAATTAAAGAAATGAAAGAGAATGAATAATGATGGAATAATAATAA
      330      340      350      360      370      380      390      400

pI  HhaI  MboIIA  HinfI  MnlIA  BatXI
    HstI  HphIB  HphIB

TATTATGGACATCTCTTTCGGCATTCCGGGATACTTCATTCAAGTTGAAGAAAGAAGTAATAGGAATCACCCTCACCCAAAT
      410      420      430      440      450      460      470      480

MnlIB

TTCTTGAGGTATAATCTATATTTTGTAGATTAAATATCGGGTAATCTTCAACTTTACTCTATTATTATGATTTTAA
      490      500      510      520      530      540      550      560

HinfI  HaeI  EcoRI

TTTGACTCTTTTATTTTGTATATCATTAATAATGCAAAATTTTGTAGAGTTCATTCAATGAAGTCTAGTTAATGAATT
      570      580      590      600      610      620      630      640

MnlIA  DdeI  DdeI

CCCCTCTGTTTTTTATTGTCCACTACTTCTTATACTTAGAATTATACTTAGAAGTGTTCGTAATAAATCTAAATCTA
      650      660      670      680      690      700      710      720

HinfI  MboI  HinfI
      MnlIB

AAAGGTTCTGATAAATCTGGAAAAAGACTGGGAATCTTTGAAAAAGAGGATCAAGAGTCATTACTCTTCAGCACAAAGAA
      730      740      750      760      770      780      790      800

MboII

AGGGGTGTGAGAAATTCCTCTTGTGCGGAAGAC
      810      820      830      840      850      860      870      880
  
```

Abb. 89 Sequenzanalyse des Klons H109
(die Hybridisierungsstelle ist unterstrichen)



Analog dem Verfahren beim Erstellen der Restriktionskarten wird die Plasmid-DNA geschnitten, in einem Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit dem Oligonukleotidgemisch hybridisiert.

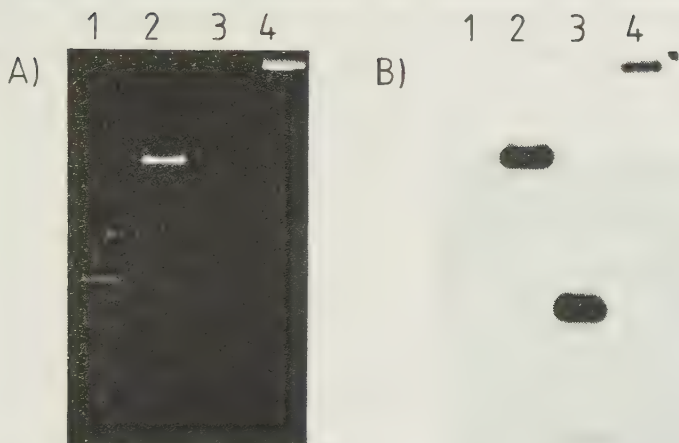


Abb. 91 Identifizierung der Hybridisierungsstelle in H109

A) 1.0 % Agarosegel

1 - 3) Restriktionen von je 2.5 µg DNA des
Klons H109 mit den angegebenen Enzymen

- 1) Hae III
- 2) Hinf I
- 3) Rsa I

4) EcoRI/HindIII - Restriktion von Lambda-DNA
(Größenstandard)

B) Autoradiogramm des zugehörigen Nitrocellulose-
filters nach Hybridisierung mit dem Oligonuk-
leotidgemisch HA5

Hybridisierungstemperatur : 37°C

Waschtemperatur : 37°C

Exposition : 1 h / -70°C / 8-fach Verstärkerf.

Bei Restriktion der Plasmid - DNA des Klons H109 mit der Endo-
nuclease HaeIII verschwindet das Hybridisierungssignal voll-
ständig. Daraus folgt, daß im Bereich einer der enthaltenen
HaeIII-Schnittstellen das Oligonukleotid bindet.

Durch Berechnen der Schmelztemperatur der sich aus klonierter
DNA und Oligonukleotid hypothetisch ausbildenden Doppelstränge
wird die richtige Position identifiziert.

Für den Klon D923 wurde das Verfahren analog durchgeführt.

Im Klon A132 ließ sich die Hybridisierungsposition bei der *Ava*II-Schnittstelle liegend lokalisieren. Dieser Befund läßt sich nur dadurch erklären, daß eine Base des klonierten DNA-Stranges bei der Hybridisierung "ausgeloopt" ist.

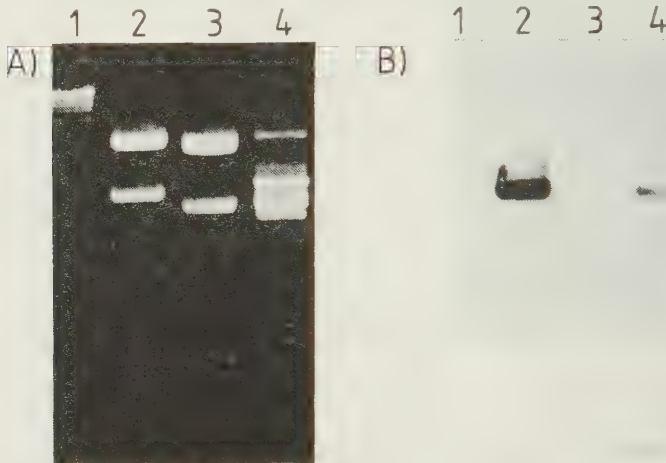


Abb. 92 Identifizierung der Hybridisierungsstelle in A132

A) 1.0 % Agarosegel

1) *Eco*RI/*Hind*III gespaltene Lambda-DNA
(Größenstandard)

2 - 4) Restriktionen von je 2.5 µg Plasmid-DNA
von A132 mit den angegebenen Enzymen

2) *Eco*RI

3) *Ava*II

4) *Eco*RI x *Ava*II

(die Restriktion ist nur partiell,
*Eco*RI-Bande ist noch schwach zu
erkennen)

B) Autoradiogramm des zugehörigen Nitro-
cellulosefilters nach Hybridisierung
mit dem Oligonukleotidgemisch HA5

Hybridisierungstemperatur : 37°C

Waschtemperatur : 42°C

Exposition : 1 h / -70°C / 8-fach Verst.

13.6.2.3 Analyse der identifizierten Sequenzen, die für die Hybridisierungen verantwortlich waren

Von den ermittelten Sequenzen wurden die sich mit dem Oligonukleotidgemisch HA5 ausbildenden Basenpaarungen zur Berechnung der hypothetischen Schmelztemperaturen verwendet.

G / C - Paarung	4°C
A / T - Paarung	2°C
G / T - Paarung	1°C
eine Base, die nicht im Doppelstrang Platz findet	-4°C

Tab. 18 Beiträge der einzelnen Basenpaarungen zur Kalkulation der Schmelztemperatur

A132	5' A-T-A-A-A-G-G-A-T-G-G ^T C-C-A-T-T-T-C-T 3'
	* * * * * *
	3' T-T-A-C-G-C-C-T-A-C-C-G-G-T-A-A-A-A-G-G 3'
	G T G G G
	Pos.: 123 - 143 SCHMELZTEMP.: 44°C
H109	5' T-T-A-A-T-A-G-A-T-G-G-C-C-G-T-T-T-G-A 3'
	+ * * * * *
	3' T-T-A-C-G-T-C-T-A-C-C-G-G-T-A-A-A-A-G-G 5'
	G C G G G
	Pos.: 34 - 53 SCHMELZTEMP.: 40°C
D923	5' G-G-A-G-C-G-G-A-T-G-G-C-C-G-T-G-C-A-T-C 3'
	+ * * * * *
	3' T-T-A-C-G-C-C-T-A-C-C-G-G-T-A-A-A-A-G-G 5'
	G T G G G
	Pos.: 173 - 192 SCHMELZTEMP.: 46°C

Abb. 93 Zusammenstellung der identifizierten Sequenzbereiche der analysierten Klone, die die Hybridisierung verursachten

Der Strang der klonierten DNA ist fettgedruckt, darunter ist die Sequenz des Oligonukleotidgemisches HA5 dargestellt. Bei Positionen, die mehr als eine Base enthalten, ist jeweils die nicht an der Hybridisierung beteiligte Base darunter angegeben.

Ergebnis

Es konnte kein Klon gefunden werden, der mit der Sequenz des Oligonukleotidgemisches vollkommene Homologie gehabt hätte.

Allen isolierten Klonen ist gemein, daß an Hybridisierungspositionen, an denen A/G - Basengemische im Oligonukleotid vorliegen sollten, immer Adenin und in keinem Fall Guanin eine Basenpaarung eingehen konnte.

Eine Sequenzanalyse des verwendeten Oligonukleotidgemisches HA5 führte zu dem Ergebnis, daß es nicht die gewünschten 32 unterschiedlichen Stränge enthielt. An allen Positionen, in denen A oder G eingebaut sein sollte, war nur A zu finden (Abb. 87).

Bei der Synthese der Oligonukleotide mußte bei der Kopplung oder Herstellung des A/G - Gemisches ein Fehler unterlaufen sein. Rücksprache mit Herrn Dr. Merz, der für die Synthese zuständig war, bestätigte diesen Verdacht.

Die selektierten Klone mit ihren hybridisierenden Teilsequenzen entsprachen den stringentesten Bedingungen, unter denen mit dem vorliegenden Oligonukleotidgemisch Hybridisierungssignale beobachtet werden konnten.

Aus zeitlichen Gründen (das Selektionsverfahren, inklusive Sequenzieren der gefundenen Klone, dauert etwa 3 - 6 Monate) war es nicht mehr möglich, diese Experimente mit vollständigen Oligonukleotidgemischen zu wiederholen.

Die Isolierung der analysierten Klone läßt die Annahme berechtigt erscheinen, daß mit Hilfe des hier dargestellten Anreicherungsverfahrens mit korrekten Oligonukleotiden auch die gesuchte Sequenz zu finden gewesen wäre.

IV. DISKUSSION

Die Biotechnologie hat in den letzten Jahren einen kometenhaften Aufstieg genommen und Prognosen sagen ihr voraus, daß sie in den nächsten Jahrzehnten tiefgreifendere Änderungen unserer Zivilisation bewirken wird, als es die Mikroelektronik in den vergangenen 20 Jahren vermochte.

Im Jahre 1967 erschien der erste wissenschaftliche Taschenrechner der Firma Texas Instruments am Markt. Er hatte den beträchtlichen Preis von \$ 700. Für 50.- DM bekommt man heute, keine zwei Jahrzehnte später, in jedem Kaufhaus ein weitaus leistungsfähigeres Gerät.

Parallelen zu dieser Entwicklung sind in der Biotechnologie zu erwarten. Kostbare Proteine, wie z.B. Insulin, Interferon, Wachstumshormon und die Gerinnungsfaktoren des Blutes, sind Substanzen, bei denen die klassische Chemie versagt, wenn es gilt, solche hochkomplexen Moleküle stereochemisch exakt zu synthetisieren. Sie müssen aus natürlichen Quellen isoliert werden, in denen sie meist nur in geringsten Mengen vorkommen. Der Mensch befindet sich, was die Gewinnung solcher Stoffe betrifft, gewissermaßen immer noch auf der Stufe des Jägers und Sammlers.

Die oben angeführten populären Beispiele biotechnologisch hergestellter Produkte, allesamt hochwirksame Medikamente, befinden sich noch im Entwicklungsstadium oder der klinischen Erprobung. Noch sind sie zwar nicht billiger als ihre aus natürlichen Ressourcen isolierten Geschwister; berücksichtigt man jedoch den zu erwartenden Preisverfall dieser Substanzen, werden sie ihre Entwicklungskosten wahrscheinlich nie amortisieren.

Doch die, auch an diesen Beispielen erarbeiteten Kenntnisse, Methoden und Verfahren haben unser Verständnis der belebten Natur grundlegend erweitert und stellen die Basis für die kommerzielle Umsetzung des neuen Wissens dar.

Schon denkt man daran, nicht nur Proteine biotechnologisch herzustellen, die selbst als Medikament eingesetzt werden, sondern auch Enzyme, die in die Biosynthese wichtiger Arzneistoffe involviert sind. Die Verfügbarkeit substantieller Mengen dieser hochspezifischen Biokatalysatoren ist die Voraussetzung, um z.B. die weitgehend aufgeklärte Biosynthese der Indolalkaloide im technischen Maßstab im Labor nachvollziehen zu können.

Der Klasse der Indolalkaloide entstammen so bekannte und hochwirksame Stoffe wie Ajmalin, Ajmalicin, Vincamin, Reserpin, Vincristin und Vinblastin.

Sie alle leiten sich in der Biosynthese der Pflanzen von einem zentralen Intermediat ab, dem Strictosidin (HUTCHINSON et.al. (1976), HECKENDORF u. HUTCHINSON (1977), STÖCKIGT u. ZENK (1977 a u. b)).

Daraus resultiert die hohe Bedeutung des Enzyms Strictosidinsynthase, das die stereospezifische Kondensation von Tryptamin und Secologanin zu 3 α (S)-Strictosidin katalysiert.

Auch die nachfolgenden Enzyme in den Biosyntheseketten zur Bildung der oben angeführten Stoffe sind gefunden (HEMSCHIEDT (1979), HEMSCHIEDT (1983), PFITZNER A. et.al. (1984), PFITZNER u. STÖCKIGT (1983), ZENK (1980)), oder befinden sich in der Erforschung.

Inhalt der vorliegenden Arbeit war es, die Grundlagen für die Klonierung von Enzymen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels am Beispiel der Strictosidinsynthase zu erarbeiten.

TREIMER (1979) und PFITZNER (1984) konnten die Strictosidinsynthase aus Catharanthus roseus Suspensionszellkulturen anreichern und charakterisieren. Dabei wurde von PFITZNER (1984) das Vorliegen multipler Enzymformen in dieser Pflanze entdeckt; nicht geklärt werden konnte die proteinchemische Art oder genetische Ursache der Heterogenität.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Quelle für die Strictosidinsynthase gesucht, bei der nur eine Form des Enzyms zu beobachten ist, und konnte in der Zellkultur Tina30 von Rauwolfia serpentina gefunden werden.

Für die Anzucht des Pflanzengewebes zur Isolierung der Strictosidinsynthese wurden erstmals Fernbachkolben verwendet. Es konnte gezeigt werden, daß sie den Kulturen durch ihre größere Gasaustauschfläche bessere Wachstumsbedingungen bieten als Erlenmeyerkolben mit gleichem Mediumvolumen.

Mit ihnen wurde die Kapazität von Laborfermentern mit den konventionellen Verfahren und Einrichtungen der Suspensionszellkulturtechnik erreicht.

Die Optimierung der Kultivierungsbedingungen und der Gewbeernte erfolgte mit einer neu entwickelten Methode zur zerstörungsfreien Bestimmung der Wachstumsphase.

Sie macht sich zunutze, daß ein Teil des in den Nährmedien enthaltenen Zuckers nach Metabolisierung als Kohlendioxid freigesetzt wird. Das Entweichen des Kohlendioxids führt zu einer steten Gewichtsabnahme der Zellkultur. Die Geschwindigkeit des Gewichtverlustes ist korreliert mit der Zahl der lebenden und Stoffwechsel treibenden Zellen einer Suspensionskultur.

Bei LS-Medium, das 30 g Zucker pro Liter enthält, wurde mit allen untersuchten Zellkulturstämmen einheitlich eine maximale Gewichtsabnahme von 12 g beobachtet. Das entspricht einem Atmungskoeffizienten von 1, wie er bei der Energiegewinnung aus der Glykolyse zu erwarten ist.

Durch regelmäßige Probennahme aus Kulturen konnte der unmittelbare Zusammenhang zwischen dem Gewichtsverlust einer Zellkultur und ihrer Wachstumsphase verifiziert werden.

Mit dieser Methode ist es möglich geworden, durch Verfolgen des leicht zugänglichen Kulturgewichtes die Wachstumsphase jedes einzelnen Kolbens bei der Gewebeproduktion zu kontrollieren und so den Ertrag an Inhaltsstoffen, wie z.B. der Strictosidinsynthese, zu optimieren.

Zur Isolierung der Strictosidinsynthese in aktiver Form wurden ausschließlich die physikalischen und chemischen Eigenschaften dieses Moleküls genutzt.

Dabei kamen, nach einer konventionellen Vorreinigung, für die letzten Anreicherungs-schritte leistungsfähige Protein-HPLC - Verfahren zum Einsatz.

Affinitäts- und Immunaффinitätschromatographie haben sich in Tests erwartungsgemäß als sehr spezifische Reinigungsverfahren erwiesen, kamen wegen des auch schon von PFITZNER (1984) und AMANN (1986) beschriebenen, raschen Kapazitäts- und Selektivitätsverlustes der verwendeten Adsorbentien jedoch nicht zum präparativen Einsatz.

Die Strictosidinsynthese konnte mit 35%-iger Ausbeute zur Homogenität gereinigt werden. Dies entspricht einer 920-fachen Anreicherung. Insgesamt wurden im Laufe der Arbeit etwa 30 mg homogenes Enzym präpariert.

Die Bestimmung des Molekulargewichtes durch Gelfiltration ergab 30000 Dalton, mit SDS-Elektrophorese wurde 35000 Dalton ermittelt. Diese Diskrepanz beruht auf dem Kohlenhydratanteil des Proteins (BETTELHEIM (1977)) und ist auch für die multiplen Strictosidinsyntheseformen aus C. roseus beschrieben (PFITZNER (1984)).

Als reales Molekulargewicht ist das durch Gelfiltration bestimmte zu betrachten.

Mit 5.3 % Kohlenhydratanteil, der sich aus Xylose, Mannose, Glucose und Glucosamin zusammensetzt, gehört die Strictosidinsynthese zu den schwach glykosilierten Proteinen.

Durch Perjodatspaltung der Zuckerkomponenten konnte gezeigt werden, daß er für die katalytische Aktivität des Enzyms nicht essentiell ist. Dieser Befund ist für die geplante Expression dieses Enzyms in Prokaryonten von Bedeutung, da diese kein Glykosilierungssystem besitzen.

Nach Auftrennen der Gesamtfraktion der löslichen Proteine aus R. serpentina mittels isoelektrischer Fokussierung und anschließender Perjodatbehandlung ist durch Anfärbung mit Schiff's Reagenz eine Vielzahl von Glykoproteinen nachweisbar. Glykosilierung der Proteine ist offensichtlich die Regel.

Die Kohlenhydrate dienen wahrscheinlich ausschließlich dem spezifischen Transport und der Kompartimentierung der Strictosidinsynthese.

Der Isoelektrische Punkt des Proteins liegt bei pH 4.5, das Optimum der Enzymaktivität bei pH 6.5 und 47°C.

Die Affinität des Enzyms zu Secologanin und Tryptamin läßt sich durch den für beide Substrate gleichen K_m -Wert von 4 mM charakterisieren. Die bei der Bestimmung der Abhängigkeit der Enzymaktivität von den Substratkonzentrationen beobachtete positive Kooperativität, die sich in einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1.4$ ausdrückt, ist nicht durch das Zusammenwirken von Untereinheiten zu erklären. Nach Hitzedenaturierung des Enzyms unter Anwesenheit von SDS ist elektrophoretisch nur eine Polypeptidkette mit einem fiktiven Molekulargewicht von 35000 Dalton nachweisbar.

Die beobachteten Enzymcharakteristika stimmen qualitativ mit den von PFITZNER (1984) und MIZUKAMI *et.al.* (1979) für die Strictosidinsynthaseformen aus C. roseus ermittelten Daten überein, was auf Grund der nahen Verwandtschaft der beiden Stamppflanzen, beide gehören zur Familie der Apocynaceae, zu erwarten war.

Einzig bei der Enzymstabilität ist von essentiellen Unterschieden zu berichten.

Die gereinigte Strictosidinsynthase aus R. serpentina ist mit einer Halbwertszeit der Enzymaktivität bei 37°C von 36 Tagen etwa 170-mal stabiler als die entsprechenden Enzyme aus C. roseus.

Nach der von PFITZNER (1984) beschriebenen Methode an CNBr-aktivierter Sepharose immobilisiertes Protein ist dagegen mit 100 Tagen Halbwertszeit bei 37°C nur mehr um 50 % stabiler als die immobilisierten Catharanthus Enzyme.

Immobilisierung verursacht eine Steigerung der Stabilität der Strictosidinsynthase aus R. serpentina um den Faktor 3, bei den Enzymen aus C. roseus jedoch auf das 300-fache.

Die Reinigung und vollständige Charakterisierung der Strictosidinsynthase aus R. serpentina bildeten die Basis für die folgenden gentechnologischen Arbeiten.

Die wesentlichen Voraussetzungen dafür sind hier noch einmal stichpunktartig zusammengefaßt:

- Die Strictosidinsynthase ist das Schlüsselenzym der Indolalkaloid-Biosynthese.
Eine Vielzahl bereits seit langem therapeutisch verwendeter Alkaloide leitet sich aus ihrem Enzymprodukt ab.
- Das Protein kann in Milligrammengen bis zur Homogenität angereichert werden.
Dadurch steht ausreichend Material für die Gewinnung von Antikörpern und die Sequenzanalyse zur Verfügung.
- Das Enzym wird als einheitliches Protein isoliert, multiple Formen sind nicht nachweisbar.
Es gibt demnach keinen Anhaltspunkt für genetische Heterogenitäten, wie sie für die Catharanthus Enzyme nicht ausgeschlossen werden konnten.
- Die Strictosidinsynthase ist immobilisierbar, was für den präparativen Einsatz große Vorteile bietet.
- Sowohl lösliches wie auch immobilisiertes Enzym haben bei einer Arbeitstemperatur von 37°C mit einer Halbwertszeit von 5 bzw. 15 Wochen eine auch unter ökonomischen Aspekten ausreichende Stabilität.

Die angeführten Vorarbeiten und Enzymeigenschaften rechtfertigten es, die Arbeiten zur Klonierung dieses Proteins aufzunehmen, um es für den technischen Einsatz verfügbar zu machen. Die sich während des Fortgangs der Untersuchungen abzeichnenden Probleme und die erarbeiteten Lösungsmöglichkeiten sind von allgemeiner Bedeutung, da dieses Protein als Modellfall für die Klonierung eines Enzyms des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels betrachtet werden kann.

Für die Isolierung des Gens erschien die Verwendung von Oligonukleotiden dem Einsatz von immunologischen Detektionssystemen überlegen.

Durch Hybridisierungsexperimente sind die einzelnen Schritte der Isolierung und Klonierung von m-RNA bzw. DNA direkt überprüfbar.

Die Verwendung von Antikörpern bedingt dagegen immer einige zusätzliche, teils kritische Reaktionen, wie die Ligation von Linkermolekülen an die zu klonierende DNA, damit das richtige Leseraster erreicht werden kann, oder die in vitro-Translation von m-RNA, die nur geringe Kapazität hat und besondere Reinheitsanforderungen an die Substrate stellt.

Bei dem Versuch durch Analyse des Aminoterminus' des Proteins die nötigen Sequenzinformationen für die Ableitung von Oligonukleotiden zu erhalten, mußte festgestellt werden, daß das Aminoende der Strictosidinsynthase für Edman-Abbau nicht zugänglich ist. Die Art der Blockierung konnte nicht aufgeklärt werden.

Teilsequenzen des Enzyms konnten durch Sequenzanalyse isolierter Peptide aus tryptischen Spaltungen des Proteins ermittelt werden.

Daraus wurde die Sequenz von Oligonukleotidgemischen an Hand des universellen genetischen Codes abgeleitet.

Eine Auswahl bestimmter Basentriplets für einige Aminosäuren an Hand von sogenannten "Codon usage" - Tabellen war nicht möglich, da für diese Pflanzenfamilie keine Daten vorliegen.

Unter den in der GenBank Genetic Sequence Data Bank, Release 38.0 (MARUYAMA et.al. (1986)) unter dem Oberbegriff "Pflanzen" gespeicherten 144 Gensequenzen, sind allein 48, die in Organellen, Mitochondrien und Chloroplasten, codiert sind. 80% der restlichen 96 dort verzeichneten Gene stammen aus Hefen. Von den verbleibenden 20% stammen die meisten aus Nutzpflanzen wie Weizen, Gerste und Mais, die zu den Monocotyledonen gehören. Bei den wenigen Genen von Pflanzen aus der Klasse der Dicotyledone, wie zum Beispiel der Chalkonsynthase aus Petersilie und einigen Maisgenen, sind keine auffälligen Präferenzen für die Verwendung bestimmter Basentriplets zu erkennen.

Durch Hybridisierung mit Oligonukleotiden wurde versucht, spezifische poly-A⁺-m-RNA der Strictosidinsynthase nachzuweisen. Trotz Variation der Aufschlußmethode und des Alters des verwendeten Zellkulturgewebes konnte kein Hybridisierungssignal beobachtet werden.

Bei in der Literatur beschriebenen Beispielen von Pflanzenproteinen, deren Gene durch m-RNA/c-DNA - Klonierung gefunden wurden, konnte die Induzierbarkeit der spezifischen m-RNA-Synthese ausgenutzt werden (LAWTON et.al. (1983), RAGG u. HAHNBROCK (1980), HERSHEY et.al. (1984)).

Eine Induzierung der m-RNA der Strictosidinsynthase konnte nicht erreicht werden.

Die Versuche zur Isolierung des Strictosidinsynthasegens durch Isolierung von poly-A⁺-m-RNA und die Klonierung von c-DNA wurden, da der m-RNA-Gehalt der Zellen ohne Induktion, wie durch die Hybridisierungsexperimente gezeigt wurde, zu gering war, wegen der geringen Erfolgsaussichten eingestellt.

Die mangelnde Synchronisierung der Zellen ist das entscheidende Handikap von Suspensionszellkulturen im Hinblick auf die Isolierung von m-RNA Spezies, die nur in niedriger Kopienzahl pro Zelle auftreten, wie das auch für die Enzyme der Alkaloidbiosynthese zu erwarten ist.

Wenn es gelingen sollte, eine spezifische Induktionsmöglichkeit für die Transkription der Gene der Alkaloidbiosynthese zu finden, wäre die c-DNA Klonierung die Methode der Wahl.

Als Alternative wurde eine genomische Genbank in Charon 4A - Phagen angelegt. Sie enthält 3.6×10^4 Klone mit durchschnittlich 18 kb klonierter Pflanzen-DNA.

Nach Amplifizierung waren 98.6 % der infektiösen Phagenpartikel Rekombinante, was die hohe Effizienz des präparierten Vektors verdeutlicht (vgl. MANIATIS et.al. (1984)).

Da die Genomgröße von R. serpentina nicht bekannt ist, kann nicht abgeschätzt werden, ob sie eine "repräsentative" Genbank darstellt. Geht man davon aus, daß diese Pflanze ein Genom von der Größenordnung des Menschen hat, so besteht nur eine Wahr-

scheinlichkeit von 10% darin ein "single-copy" - Gen wiederzufinden. Zieht man als Vergleich jedoch die Größe des Genoms der Bohne oder Petersilie (GIERSON u. COVEY (1984)) heran, so erhöht sich diese Wahrscheinlichkeit auf etwa 50%.

Ein elementares Kriterium für die Beurteilung einer genomischen Genbank ist die Kenntnis der Größe des Genoms das durch sie repräsentiert werden soll. Da innerhalb der Pflanzen die Genomgröße vom 0.01- bis zum 100-fachen des Menschengenoms schwankt, sind Vergleiche mit anderen Pflanzenspezies, selbst wenn es sich um nahe Verwandte handelt, nur von bedingter Aussagekraft.

Dazu kommt, daß sich die Chromosomenzahl und -struktur in Zellkulturen von der der Ganzpflanze stark unterscheiden kann.

Untersuchungen an Zellkulturen von C. roseus von DEUS (1980) haben gezeigt, daß selbst innerhalb einer Kultur eine auffällige Heterogenität der Chromosomenzahl pro Zelle zu finden ist. Sie beobachtete in Gewebe aus einer Suspensionskultur 8 - 81 Chromosomen pro Zelle. Nur 0.5 % der untersuchten Zellen waren normal diploid, enthielten 16 Chromosomen wie die Stammpflanze.

Die Bestimmung der Genomgröße aus Zellkulturgewebe, z.B. durch Feulgenfärbung und Mikrodensitometrie, wird deshalb nur eine grobe Abschätzung liefern können, da die beobachteten Chromosomenzahlen und -formen eine reine Polyploidisierung der Zellen ausschließen.

Selbst wenn es gelingt, Genbanken mit zehnmal höherer Klonzahl anzulegen, läßt sich mit dieser Vorgehensweise das Grundproblem der Isolierung von Pflanzengenomen nicht umgehen. Bis zu 85% des Pflanzengenoms bestehen aus nicht codierenden, repetitiven Sequenzen (MURRAY et.al. (1978)). Bei der Klonierung mit Lambda-Phagen kann keine Unterscheidung zwischen den codierenden und den nicht codierenden Bereichen gemacht werden. Letzere sind aber die Ursache, daß für die Repräsentierung eines Pflanzengenoms astronomische Klonzahlen nötig sind.

Basierend auf den Erfahrungen mit den beiden Standardmethoden zur Isolierung eines Gens (c-DNA und genomische Genbanken)

wurde eine Methode entwickelt, die darauf beruht, daß bei Restriktionen die hoch repetitiven DNA-Bereiche der Pflanzengenome keine statistischen Spaltungsmuster ausbilden. Unter der Annahme, daß jedes repetitive Element durchschnittlich 1000-mal wiederholt auftritt (MURRAY et.al. (1978), FLAVELL (1982)), entsteht aus den 80 % repetitiver Sequenzen des Pflanzengenoms nur etwa 1/1000 der Anzahl von unterschiedlichen Fragmenten, die bei statistischer Schnittstellenverteilung zu erwarten wäre.

Nach Spaltung mit Endonucleasen resultiert aus der überwiegenden Menge der Gesamt-DNA einer Pflanzenzelle, den hoch repetitiven Regionen, nur ein geringer Anteil an der Menge der unterschiedlichen Restriktionsfragmente, wobei allerdings diejenigen aus den repetitiven Regionen jeweils in durchschnittlich 1000-facher Kopie auftreten.

Durch sukzessive Anreicherungs-schritte, bei denen ausschließlich nach den Restriktionsmustern und der Größe hybridisierender DNA-Fragmente selektiert wird, wobei die Anzahl einzelner Fragmente keine Rolle spielt, kann DNA aus dem hoch repetitiven Anteil des Genoms wirkungsvoll entfernt werden.

Aus der so vorselektierten und angereicherten Pflanzen-DNA können dann mit konventionellen Klonierungs- und Screeningmethoden die positiven Klone durch Analyse einiger Tausend statt einiger Hunderttausend, wie das bei genomischen Genbanken nötig wäre, isoliert werden.

Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten wurden in 8000 Klonen von durch zwei Anreicherungs-schritte vorselektierter DNA, drei positive Klone durch Detektion mit Oligonukleotiden identifiziert.

Die Sequenzanalyse dieser Klone führte zu dem Ergebnis, daß die isolierten Sequenzen alle mit ein und demselben Oligonukleotid aus dem verwendeten Oligonukleotidgemisch hybridisierten, was zu der Vermutung Anlaß gab, daß dieses Gemisch nicht alle der postulierten DNA-Stränge enthielt. Eine Analyse des Oligonukleotidgemisches bestätigte diesen Verdacht. Die gewünschte 32-fache Entartung war nicht gegeben. In Positionen, in denen

A/G-Gemische eingebaut sein sollten, konnte nur A festgestellt werden. Bei dem Selektionsverfahren waren nur die zu den vorliegenden Oligonukleotiden bestmöglich passenden Sequenzen gefunden worden, die aber keine vollständigen Homologien zeigten, was erst nach der Sequenzanalyse ersichtlich war. Die Selektion erfolgte mit den stringentesten Bedingungen, nämlich Hybridisierung in 2xSSC bei 42°C, bei denen noch ein Hybridisierungssignal beobachtet werden konnte.

Aus Zeitmangel konnte das Verfahren nicht mit intakten Oligonukleotidgemischen wiederholt werden. Die Isolierung der gefundenen Klone bestätigt jedoch, daß durch diese Methode sehr spezifisch einzelne DNA-Sequenzen anreicherbar sind, bis sie durch Einzelselektion identifiziert werden können. Die Ausbeute von drei positiven Klonen aus 8000 getesteten beweist, daß es sich nicht um DNA-Bereiche aus hoch repetitiven Regionen handeln konnte, denn in diesem Fall hätte eine weitaus größere Zahl von positiv reagierenden Rekombinanten zu beobachten sein müssen.

Die Verwendung von Oligonukleotidgemischen ist im allgemeinen nicht zu umgehen. Die vollständige Analyse einer derartigen Hybridisierungsprobe, z.B. durch die "mobility-shift" - Methode, ist aufwendig und schwierig. Dennoch muß, als Lehre aus den gemachten Erfahrungen, dringend dazu angeraten werden. Wenn man die zeitlichen Verluste bedenkt, die seltene, aber mögliche Fehler bei der Oligonukleotidsynthese verursachen, ist dieser Aufwand gerechtfertigt.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Arbeit war es, für die Strictosidinsynthase, dem zentralen Enzym der Indolalkaloidbiosynthese, die Voraussetzungen für die Isolierung des zugehörigen Gens zu schaffen und einführende gentechnologische Arbeiten für dieses Enzym des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels durchzuführen.

1. Es konnte in Zellkulturen von R. serpentina eine Quelle für dieses Enzym gefunden werden, bei der keine multiplen Formen der Strictosidinsynthase nachweisbar sind.
2. Durch Einsatz neuer Kulturgefäße für pflanzliche Suspensionszellkulturen konnte die Kapazität der konventionellen Gewebekulturtechnik in den Bereich von Laborfermentern ausgedehnt werden.
3. Es wurde eine Methode zur zerstörungsfreien Bestimmung der Wachstumsphase von Suspensionszellkulturen erarbeitet.
4. Aus Zellkulturen von R. serpentina wurde die Strictosidinsynthase bis zur Homogenität gereinigt (920-fache Anreicherung bei 35% Ausbeute) und insgesamt etwa 30 mg präpariert. Homogene Enzympräparationen haben eine spezifische Enzymaktivität von 150 nkat/mg. Die molare Aktivität dieses Enzyms ist 4.5 s^{-1} .
5. Das Enzym wurde charakterisiert. Dieses Protein hat ein Molekulargewicht von 30000 Dalton, sein Isoelektrischer Punkt liegt bei pH 4.5. Das Optimum der Enzymaktivität war bei pH 6.5 und 47°C zu beobachten. Die K_m -Werte für beide Substrate liegen bei 4 mM. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von den Substratkonzentrationen zeigt positive Kooperativität, die einem Hill-Koeffizient von $n_H = 1.4$ entspricht. Das Enzym besteht jedoch nicht aus Untereinheiten, sondern aus einer einzigen Polypeptidkette. Für die Abnahme der Enzymaktivität bei 37°C wurde eine Halbwertszeit von 36 Tagen für gereinigte Enzympräparationen ermittelt. Der Kohlenhydratanteil des Enzyms wurde analysiert. Bezogen auf das Gesamtprotein setzt er sich aus 1.1 % Xylose, 2.6 % Mannose und 1.6 % Glukose zusammen.

Durch Perjodatspaltung der Zuckerkomponenten konnte gezeigt werden, daß sie für die katalytische Funktion des Enzyms nicht essentiell sind.

6. Das Enzym wurde mit 38 % Aktivitätsausbeute an CNBr-aktivierter Sepharose immobilisiert. Dadurch erhöht sich die Stabilität des Enzyms bei 37°C um den Faktor 3 auf 100 Tage. 5 g Strictosidin wurden mit immobilisiertem Enzym synthetisiert.
7. Es wurde eine Blockierung des Aminoterminus' des Proteins gegenüber Edmanabbau festgestellt. Teilsequenzen des Enzyms konnten durch Sequenzanalyse von isolierten Peptiden aus tryptischen Spaltungen des Proteins ermittelt werden. Der Anteil der ermittelten Sequenzen deckt etwa 20 % der gesamten Aminosäuresequenz des Enzyms ab.
8. Versuche zum Nachweis spezifischer poly-A⁺-m-RNA der Strictosidinsynthase, durch Hybridisierung mit Oligonukleotidgemischen blieben erfolglos.
9. Es wurde eine Methode optimiert, mit der aus pflanzlichen Zellkulturen DNA unter vollständiger Abtrennung der enthaltenen Polysaccharide isoliert werden kann.
Der G/C-Gehalt der DNA aus R. serpentina wurde zu 47 % bestimmt.
10. Eine Genbank in Charon 4A - Phagen wurde angelegt. Sie enthält 3.6×10^4 Klone mit durchschnittlich 18 kb klonierter Pflanzen-DNA.
11. Es wurde eine Methode zur sukzessiven Anreicherung von DNA-Fragmenten, die mit Oligonukleotidgemischen hybridisieren, ausgearbeitet, bei der eine weitgehende Abtrennung von DNA-Sequenzen aus hoch repetitiven, nicht codierenden Regionen des Pflanzengenoms erreicht wird.
12. Drei mit dieser Methode isolierte Klone wurden sequenziert und die genauen Positionen der Hybridisierung identifiziert.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- ADHYA, S., GOTTESMAN, M., De CROMBRUGGHE, B.: Release of Polarity in Escherichia coli by Gene N of Phage λ : Termination and Antitermination of transcription.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71 (1974) 2534-2538.
- AMANN, M.: (S)-Tetrahydroprotoberberinoxidase: Das zentrale Enzym in der Oxidation von Benzylisochinolinalkaloiden.
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1986).
- ANDERSON, P.M.: Purification and Properties of the Inducible Enzyme Cyanase.
Biochemistry, 19 (1980) 2882-2888.
- ARENS, H: Aufstellung und Anwendung eines Radioimmunoassays für Serpentin und Raubasin.
Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum (1976).
- BATTERSBY, A.R., BROWN, R.T., KAPIL, R.S., MARTIN, J.A., PLUNKETT, A.O.: Role of Loganin in the Biosynthesis of Indole Alkaloids.
Chem. Commun., (1966) 812-813.
- BATTERSBY, A.R., BURNETT, A.R., PARSONS, P.G.: Alkaloid Biosynthesis. Part XV. Partial Synthesis and Isolation of Vincoside and Isovincoside: Biosynthesis of the Three Major Classes of Indole Alkaloids from Vincoside.
J. Chem. Soc., (C) (1969) 1193-1200.
- BENAJIBA, A., MAROUX, S.: Purification and characterization of an aminopeptidase A from hog intestinal brush-border membrane.
Eur. J. Biochem., 107 (1980) 381-388.
- BENSADOUN, A., WEINSTEIN, D.: Assay of Proteins in the Presence of Interfering Materials.
Anal. Biochem., 70 (1976) 241-250.

- BETTELHEIM, F.A.: Molecular Weight Determination and Physical Properties. In: The Glycoconjugates, Vol. I. Horowitz, M.I., Pigman, W. (eds.). Academic Press, London New York, (1977) 79-96.
- BEYREUTHER, K., ADLER, K., FANNING, E., MURRAY, C., KLEMM, A., GEISLER, N.: Amino-Acid Sequence of Lac Repressor from Escherichia coli. Eur. J. Biochem., 59 (1975) 491-509.
- BIGELIS, R., UMBRAGER, H.E.: Purification of yeast α -isopropylmalate isomerase. High ionic strength hydrophobic chromatography. J. Biol. Chem., 250 (1975) 4315-4321.
- BIRNBOIM, H.C., DOLY, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res., 7 (1979) 1513-1522.
- BLATTNER, F.R., WILLIAMS, B.G., BLECHL, A.E., FABER, H.E., DENNISTON - THOMPSON, K., FURLONG, L., GRUNWALD, D.J., KIEFER, D.O., MOORE, D.D., SCHUMM, J.W., SHELDON, E.L., SMITHIES, O.: Charon Phages: Safer Derivatives of Bacteriophage Lambda for DNA Cloning. Science, 196 (1977) 161-169.
- BRADFORD, M.: A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye-Binding. Anal. Biochem., 72 (1976) 248-254.
- BROWN, R.T., LEONARD, J., SLEIGH, S.K.: The Role of Strictosidine in Monoterpenoid Indole Alkaloid Biosynthesis. Science, 196 (1977) 161-169.
- CLEWELL, D.B., HELINSKI, D.R.: Supercoiled Circular DNA-Protein Complex in Escherichia coli: Purification and Induced Conversion to an Open Circular DNA Form. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 62 (1969) 1159-1166.

- CLARKE, L., CARBON, J.: A colony bank containing synthetic Cole1 Hybrid Plasmids representative of the entire E. coli genome.
Cell, 9 (1976) 91-99.
- CLOVER, D.M.: DNA Cloning, A Practical Approach, Vol. I.
IRL Press, Oxford, (1985) 24-35.
- COHEN, S.N., CHANG, A.C.Y., HSU, L.: Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of Escherichia coli by R-Factor DNA.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69 (1972) 2110-2114.
- COOPER, T.G.: Biochemische Arbeitsmethoden.
de Gruyter, Berlin New York, (1980) 179-221.
- De LEY, J.: Reexamination of the Association Between Melting Point, Buoyant Density, and Chemical Base Composition of Deoxyribonucleic Acid.
J. Bacteriology, 101 (1970) 738-754.
- DEUS, B.: Stoffwechselleistungen varianter Stämme pflanzlicher Zellkulturen.
Dissertation, Ruhr-Universität Bochum (1980).
- De WET, J.R., DANIELS, D.L., SCHROEDER, J.L., WILLIAMS, B.G., DENNISTON - THOMPSON, K., MOORE, D.D., BLATTNER, F.R.: Restriction Maps for Twenty-One Charon Vector Phages.
J. Virology, 33 (1980) 401-410.
- FELSENFELD, G.: Analysis of temperature-dependent absorption spectra of nucleic acids.
Proc. Nucleic Acid Res., 2 (1971) 233-244.
- GIERSON, D., COVEY, S.N.: Plant Molecular Biology.
Blackie, Glasgow, (1984) 10-36.
- GLAZER, A.N., DELANGE, R.J., SIGMA, D.S.: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Work, T.S., Work, E. (eds.).
Elsevier, Amsterdam New York Oxford, (1982) 60-128.

- GOTTSCHALK, A.: Glycoproteins. Vol. 5 Part B.
Elsevier, Amsterdam London New York, (1972) 1044-1048.
- HECKENDORF, A.H., HUTCHINSON, C.R.: Biosynthesis of Camptothecin. II. Confirmation that Isovincoside, not Vincoside, is the Penultimate Biosynthetic Precursor of Indol Alkaloids. *Tetrahedron Letters*, 48 (1977) 4153-4154.
- HEMSCHIEDT, T.: Nachweis, Anreicherung und Charakterisierung spezifischer Strictosidin- β -Glucosidasen aus Catharanthus roseus Zellsuspensionskulturen.
Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum (1979).
- HEMSCHIEDT, T.: Bildung und Umsetzung von Iminium-Cathenamin, katalysiert durch spezifische Enzyme aus Catharanthus roseus.
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1983).
- HERSHEY, H.P., COLBERT, J.T., LISSEMORE, J.L., BARKER, R.F., QUAIL, P.H.: Molecular cloning of cDNA for Avena phytochrome.
Proc. Natl. Acad. Sci., 81 (1984) 2332-2336.
- HURN, A.L., CHANTLER, S.M.: Production of Reagent Antibodies. In: *Methods in Enzymology*, 70, Vunakis, H.V., Langone, J.J. (eds.).
Academic Press, New York London, (1980) 125-145.
- HUTCHINSON, C.R., HECKENDORF, A.H., DADONNA, P.E., HAGAMAN, E., WENKERT, E.: Biosynthesis of Camptothecin. I. Definition of the Overall Pathway Assisted by Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Analysis.
J. Am. Chem. Soc., 96 (1974) 5609-5611.
- JORDAN, E.J.: Chemische und Immunologische Untersuchung von Polysacchariden und anderen hochmolekularen Inhaltsstoffen aus Viscum album (L.).
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1985).

- KATO, Y., KOMIYA, K., SASAKI, H., HASHIMOTO, T.: Separation Range and Separation Efficiency in High-Speed Gel Filtration on TSK-Gel SW Columns.
J. Chromatography, 190 (1980a) 297-303.
- KATO, Y., KOMIYA, K., SAWADA, Y., SASAKI, H., HASHIMOTO, T.: Purification of Enzymes by High-Speed Gel Filtration on TSK-Gel Columns.
J. Chromatography, 190 (1980b) 305-310.
- KUTNEY, J.P., CRETNEY, W.J., HADFIELD, J.R., HALL, E.S., NELSON, V.R., WIGFIELD, D.C.: Studies on Indolalkaloid Biosynthesis.
J. Am. Chem. Soc., 90 (1968) 3566-3567.
- LAEMMLI, U.K.: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.
Nature, 227 (1970) 680-685.
- LAEMMLI, U.K., FAVRE, M.: Maturation of the Head of Bacteriophage T4.
J. Mol. Biol., 80 (1973) 575-599.
- LAWTON, M.A., DIXON, R.A., HAHLBROCK, K., LAMB, C.J.: Elicitor Induction of mRNA Activity
Eur. J. Biochem., 130 (1983) 131-139.
- LEETE, E.: The Biogenesis of the Rauwolfia Alkaloids. I. The Incorporation of Tryptophan into Ajmaline.
J. Am. Chem. Soc., 82 (1960) 6338-6342.
- LEETE, E.: Biogenesis of the Rauwolfia Alkaloids. II. The Incorporation of Tryptophan into Serpentine and Reserpine.
Tetrahedron Letters, 14 (1961) 35-41.
- LIU, T.Y., CHANG, Y.H: Hydrolysis of Proteins with p-Toluene-sulfonic Acid.
J. Biol. Chem., 246 (1971) 2842-2848.
- LINSMAIER, E.M., SKOOG, F.: Organic Growth Factors Requirements of Tobacco Tissue Cultures.
Physiol. Plant., 18 (1965) 110-125.

- LOEW, P., ARIGONI, D.: The Biological Conversion of Loganiin into Indole Alkaloids.
Chem. Commun., (1968) 137-138.
- LOEW, P.: Monoterpenvorstufen in der Biosynthese von Indolalkaloiden.
Dissertation, Diss.Nr. 4318, ETH Zürich (1969).
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROOK, J.: Molecular Cloning.
Cold Spring Harbor, New York, (1982) 187-403.
- MANIATIS, T., HARDISON, R.C., LACY, E., LAUER, J., O'CONNELL, C., QUON, D.: The Isolation of Structural Genes from Libraries of Eukaryotic DNA.
Cell, 15 (1978) 687-701.
- MARUYAMA, T., GOJOBORI, T., AOTA, S., IKEMURA, T.: Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data.
Nuc. Acids Res., 14 Suppl. (1986) r151-r197.
- MAXAM, A.M., GILBERT, W.: Sequencing End-labelled DNA with Base-Specific Chemical Cleavages. In: Methods in Enzymology, 65. Grossman, L., Moldave, K. (eds.).
Academic Press, New York London, (1980) 499-560.
- MIZUKAMI, H., NORDLÖV, H., LEE, S.L., SCOTT, A.I.: Purification and Properties of Strictosidine Synthase (an Enzyme Condensing Tryptamine and Secologanin) from Catharanthus roseus Cultured Cells.
Biochemistry, 18 (1979) 3760-3763.
- MOORE, S.: On the Determination of Cystine as Cysteic Acid.
J. Biol. Chem., 238 (1963) 235-237.
- MURRAY, M.G., CUELLAR, R.E., THOMPSON, W.F.: DNA sequence organisation in the pea genome.
Biochemistry, 17 (1978) 5781-5790.
- NAGAKURA, N., RÜFFER, M., ZENK, M.H.: The Biosynthesis of Monoterpenoid Indole Alkaloids from Strictosidine.
J. Chem. Soc. Perkin Trans. I (1979) 2308-2312.

- PAZUR, J.H., KLEPPE, K., CEPURE, A.: A Glycoprotein Structure from Glucose Oxidase from Aspergillus niger.
Arch. Biochem. Biophys., 111 (1965) 351-357.
- PERKAMPUS, M.H., SANDEMAN, I., TIMMONS, G.J.: UV-Atlas organischer Verbindungen.
Verlag Chemie, Weinheim, 2 (1966) D 9/32.
- PFEIFFER, B.H., ZIMMERMANN, S.B.: Polymer-stimulated ligation: enhanced blunt- or cohesive-end ligation of DNA or deoxyribonucleotides by T4 DNA ligase in polymer solutions.
Nucleic Acids Research, 11 (1983) 7853-7871.
- PFITZNER, A., STÖCKIGT, J.: Polyneuridine Aldehyde Esterase: an Unusually Specific Enzyme involved in the Biosynthesis of Sarpagine Type Alkaloids.
J. Chem. Soc., Chem. Commun., (1983) 459-460.
- PFITZNER, A., KRAUSCH, B., STÖCKIGT, J.: Characteristics of Vellosimine Reductase, a Specific Enzyme involved in the Biosynthesis of the Rauwolfia Alkaloid Sarpagine.
Tetrahedron, 40 (1984) 1691-1699.
- PFITZNER, U.: Die Strictosidin-Synthase aus Catharanthus roseus Zellkulturen: Reinigung, immunologische Charakterisierung und Immobilisierung eines Enzyms aus dem Sekundärstoffwechsel.
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München (1984).
- PLUNKETT, A.O.: Role of Loganin in the Biosynthesis of Indole Alkaloids.
Chem. Commun., (1966) 812-813.
- RADOLA, B.J.: Isoelectric Focusing in Layers of Granulated Gels. I. Thin-Layer Isoelectric Focusing of Proteins.
Biochim. Biophys. Acta, 295 (1973) 412-428.
- RAGG, H., HAHLBROCK, K.: Messenger RNA Coding for Phenylalanine Ammonia-Lyase.
Eur. J. Biochem., 103 (1980) 323-330.

- REINHARD, E.: Pharmazeutische Biologie.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, (1978)
270-276.
- RINGE, F.: Förderung der Zellproliferation unter der Einwirkung
von 2-Chloräthylenphosphorsäure bei Explantaten von
Begonia x richomondensis in steriler Kultur.
Z. Pflanzenphysiol., 76 (1972) 462-466.
- ROBERTS, R.J.: Restriction and modification enzymes and their
recognition sequences.
Nucleic Acids Res., 12 Suppl. (1984) r167-r204.
- SCOTT, A.I., LEE, S.L., DE CAPITE, P., CULVER, M.G., HUTCHIN-
SON, C.R.: The Role of Isovincoside (Strictosidine) in the
Biosynthesis of the Indole Alkaloids.
Heterocycles, 7 (1977a) 979-984.
- SCOTT, A.I., LEE, S.L., WAN, W.: Indole Alkaloid Biosynthesis:
Partial Purification of "Ajmalicine Synthetase" from
Catharanthus roseus.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 75 (1977b) 1004-1009.
- SCOTT, A.I., LEE, S.L., HIRATA, T., CULVER, M.G.: Biosynthesis
of Plant Products Using Cell Free Systems from Tissue
Cultures.
Rev. Latinoamer. Quim., 9 (1979) 131-138.
- SEIPEL, U.: Untersuchungen zur Bildung der Strictosidin-Syn-
thase in Catharanthus roseus Zellsuspensionskulturen.
Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum (1979).
- SILHAVY, T.J., BERMAN, M.L., ENQUIST, L.W.: Experiments with
Gene Fusions.
Cold Spring Harbor, New York, (1984) 89-147.
- SMITH, G.N.: Strictosidine: A Key Intermediate in the Biogene-
sis of Indole Alkaloids.
Chem. Commun., (1968) 912-914.

- SPIRO, R.G.: Analysis of Sugars Found in Glycoproteins.
In: Methods in Enzymology, 8. Neufeld, E.F., Ginsburg, V.
(eds.).
Academic Press, New York London, (1966) 3-26.
- STÖCKIGT, J., TREIMER, J., ZENK, M.H.: Synthesis of Ajmalicine
and Related Indole Alkaloids by Cell-Free Extracts of
Catharanthus roseus Cell Suspension Cultures.
FEBS Letters, 70 (1976) 267-270.
- STÖCKIGT, J., HUSSON, H.P., KAN-FAN, C., ZENK, M.H.: Cathen-
amine, a Central Intermediate in the Cell Free Biosynthe-
sis of Ajmalicine and Related Indole Alkaloids.
J. C. S. Chem. Commun., 1977 (1977) 164-166.
- STÖCKIGT, J., ZENK, M.H.: Isovincoside (Strictosidine), the Key
Intermediate in the Enzymatic Formation of Indole Alka-
loids.
FEBS Letters, 79 (1977a) 233-237.
- STÖCKIGT, J., ZENK, M.H.: Strictosidine (Isovincoside): The Key
Intermediate in the Biosynthesis of Monoterpenoid Indole
Alkaloids.
J. C. S. Chem. Commun., 1977 (1977b) 646-648.
- STÖCKIGT, J.: Enzymatic Formation of Intermediates in the Bio-
synthesis of Ajmalicine: Strictosidine and Cathenamine.
Phytochem., 18 (1979) 965-971.
- STÖCKIGT, J.: The Biosyntheses of Heteroyohimbine-Typ Alkaloids
In: Indole and Biogenetically Related Alkaloids. Phillip-
son, J.D., Zenk, M.H. (eds.).
Academic Press, New York, (1980) 113-141.
- STÖCKIGT, J., PFITZNER, A., KELLER, P.J.: Enzymatic Formation
of Ajmaline.
Tetrahedron Letters, 24 (1983) 2485-2486.

- STÜBER, K., BEYREUTHER, K.: Preparative Separation of Peptides by High Performance Liquid Chromatography. In: High Performance Liquid Chromatography in Protein and Peptide Chemistry. Lottspeich, F., Henschen, A., Hupe, K.-P. (eds.). de Gruyter, Berlin New York (1981) 205-221.
- THOMAS, R.: A Possible Biosynthetic Relationship between the Cyclopentanoid Monoterpenes and the Indole Alkaloids. Tetrahedron Letters, 16 (1961) 544-553.
- TREIMER, J.F., ZENK, M.H.: Enzymic Synthesis of Corynanthe-Type Alkaloids in Cell Cultures of Catharanthus roseus: Quantitation by Radioimmunoassay. Phytochem., 17 (1978) 227-231.
- TREIMER, J.F.: Die Strictosidin-Synthase aus pflanzlichen Zellkulturen. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum (1979).
- WEETALL, H.H.: Covalent Coupling Methods for Inorganic Support Materials. In: Methods in Enzymology, 44. Mosbach, K. (ed.). Academic Press, New York London, (1976) 134-148.
- WENKERT, E.: Biosynthesis of Indole Alkaloids. The Aspidosperma and Iboga Bases. J. Am. Chem. Soc., 84 (1962) 98-102.
- WILLIAMS, B.G., BLATTNER, F.R.: Construction and Characterization of the Hybrid Bacteriophage Lambda Charon Vectors for DNA Cloning. J. Virology, 29 No.2 (1979) 555-575.
- WINNACKER, E.L.: Gene und Klone. Verlag Chemie, Weinheim, (1984) 138-146.
- YANISH-PERRON, C., VIEIRA, J., MESSING, J.: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene, 33 (1985) 103-119.

ZENK, M.H., EL-SHAGI, H., ARENS, H., STÖCKIGT, J., WEILER, E.W., DEUS, B.: Formation of the Indole Alkaloids Serpentine and Ajmalicine in Cell Suspension Cultures of Catharanthus roseus. In: Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application. Barz, W., Zenk, M.H. (eds.). Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, (1977) 27-43.

ZENK, M.H.: Enzymatic Synthesis of Ajmalicine and Related Indole Alkaloids.
J. Natural Products, 43 (1980) 438-451.

D A N K S A G U N G

Herrn Prof. Dr. M. H. Zenk, unter dessen Anleitung diese Dissertation angefertigt wurde, möchte ich sehr herzlich für die intensive wissenschaftliche Förderung und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit danken. Die durch ihn vermittelten Einblicke und Erfahrungen sind für mich von unschätzbarem Wert.

Herrn Prof. Dr. K. Beyreuther gilt mein herzlicher Dank für seine wertvolle Unterstützung bei der Proteinsequenzierung und die stete Gastfreundschaft während der Aufenthalte an seinem Institut.

Herrn Dr. F. Lottspeich bin ich für seine tatkräftige Hilfe bei der Peptidanalyse sehr zu Dank verbunden.

Herr Prof. Dr. A. Böck hat durch meine Aufnahme in seinen Arbeitskreis ganz entscheidend zum Gelingen des gentechnologischen Teils der Arbeit beigetragen. Seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine Anregungen waren für mich überaus wertvoll. Ihm und allen seinen Mitarbeitern danke ich aufs herzlichste für die schöne Zeit, die ich in ihrem Kreis verbringen durfte.

Herrn Dipl.-Biol. H. Auer danke ich insbesondere für seine Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung und Durchsicht der Arbeit.

Lebenslauf

Am 14. Juni 1957 wurde ich , Norbert Hampp, als Sohn des Zahnarztes Anton Hampp und seiner Ehefrau Angela, geb. Brauner, in Neuburg an der Donau geboren.

Ab dem Jahr 1963 besuchte ich die Volksschule in Rennertshofen, trat 1967 in das Descartes-Gymnasium in Neuburg über, wo ich im Juni 1976 mein Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1978 nahm ich das Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians Universität in München auf, das ich im Mai 1982 abschloß.

Im Juni 1983 legte ich die Approbationsprüfung ab und erhielt im Juli 1983 die Approbation als Apotheker.

Im November 1982 begann ich unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. M. H. Zenk mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Von November 1982 bis April 1986 hatte ich eine Stelle als teilzeitbeschäftigte wissenschaftliche Hilfskraft inne.

